

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR
PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO:
INFLUÊNCIA SOBRE FATORES ANGIOGÊNICOS E
VASOATIVOS**

Laysa Lindaura Lau Rocha Cordeiro
Médica Veterinária

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR
PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO:
INFLUÊNCIA SOBRE FATORES ANGIOGÊNICOS E
VASOATIVOS**

Laysa Lindaura Lau Rocha Cordeiro

Orientador: Profa. Dra. Danila Barreiro Campos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.


2015

LAYSA LINDAURA LAU ROCHA CORDEIRO

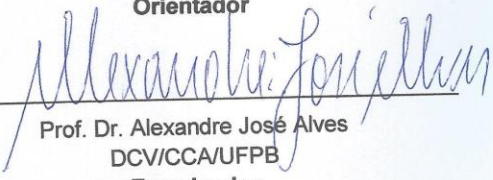
**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR
PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO:
INFLUÊNCIA SOBRE FATORES ANGIOGÊNICOS E
VASOATIVOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal do brejo
paraibano.


APROVADA EM 14/12/2015
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Danila Barreiro Campos
DCV/CCA/UFPB
Orientador



Prof. Dr. Alexandre José Alves
DCV/CCA/UFPB
Examinador



Prof. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo
UAMV/CSTR/UFCG
Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Laysa Lindaura Lau Rocha Cordeiro nasceu em 09 de outubro de 1989, na cidade de Maceió, Alagoas. Em 2007 concluiu o ensino médio no Colégio Planeta, ingressando no curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Alagoas no segundo semestre de 2008. Em agosto de 2013 formou-se como Médica Veterinária na mesma instituição, cuja sede localiza-se no município de Viçosa, no mesmo estado. Em março de 2014 ingressou Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, na categoria de mestrado. Em dezembro do mesmo ano foi aprovada no concurso público da Prefeitura Municipal de Lagoa da Canoa (AL), tomando posse do cargo de Médica Veterinária da Vigilância Sanitária Municipal em março de 2015.

DEDICATÓRIA

Ao longo de minha vida, todas as minhas conquistas são dedicadas à minha tia Salete Alves da Rocha (*in memoriam*), cujo esforços foram imensos para me ver com diploma em mãos. Nada seria possível sem você. *Saudades.*

AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus, pela chance de concluir meu mestrado e principalmente por ter me presenteado com essa família maravilhosa (pais, irmão, primos, tias e avós), que me incentivaram a buscar o caminho da educação e sempre me preencheram com cuidados e amor, me ajudando em todos os momentos difíceis. Meu amor por vocês é incondicional.

Em especial agradeço à professora Danila Barreiro Campos, pela paciência durante os ensinamentos passados e por ter me oferecido a chance de concluir o curso de mestrado do programa de pós-graduação na UFPB, acreditando que seria possível fazer tanto em tão pouco tempo.

Um agradecimento mais que especial a minha companheira de graduação e mestrado, Beatriz Braz, por todos os momentos que dividimos ao longo desses anos. Por todas as alegrias e dificuldades enfrentadas na pós-graduação. CONSEGUIMOS!

Obrigada Kaetillyn Araújo e Lanne Pinheiro por toda receptividade, assistência e amizade.

Obrigada a todos os meus colegas de turma e amigos que fiz ao longo desse tempo na cidade de Areia. Obrigada por toda receptividade, compreensão, alegrias, discussões e por todos os momentos vividos nesses dois anos.

Sumário

	Página
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO GERAL	iv
ABSTRACT	vi
CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
<i>eNOS (sintase do óxido nítrico endotelial)</i>	8
<i>GUCY1B3 (guanilato ciclase, solúvel, beta 3)</i>	10
<i>EDNRB (receptor de endotelina tipo B)</i>	11
<i>ANGPT2 (Angiopietina 2)</i>	13
OBJETIVO GERAL	16
CAPÍTULO 1 – MODULATION OF CARUNCULAR GENE EXPRESSION BY BOVINE EMBRYO DURING PLACENTATION: INFLUENCY ON ANGIOGENIC AND VASOACTIVE FACTORS	17
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Página

Figure1. Quantitative real time PCR analysis of *eNOS* mRNA in bovine cotyledon-associated caruncles (dark gray bars) and caruncles from non-gravid horn (light gray bars). *eNOS* mRNA expression did not vary between caruncles from gravid and non-gravid horns from days 30 to 40 in AI gestations; however, the gene was downregulated in caruncles from non-gravid horns at day 40 of IVF gestations. Means with different superscripted letters are significantly different ($p<0.05$) at same gestational age. Asterisks characterize means with significant differences ($p<0.05$) between AI and IVF gestations. AI: artificial insemination; IVF: in vitro fertilization 26

Figure 2. Quantitative real time PCR analysis of *EDNRB* mRNA in bovine cotyledon-associated caruncles (dark gray bars) and caruncles from non-gravid horn (light gray bars). *EDNRB* gene showed higher expression in cotyledon-associated caruncles during days 30 and 35 of AI gestations. The gene was upregulated in cotyledon-associated caruncles at day 40 in IVF gestations. Means with different superscripted letters are significantly different ($p<0.05$) at same gestational age. Asterisks characterize means with significant differences ($p<0.05$) between AI and IVF gestations. AI: artificial insemination; IVF: in vitro fertilization . 27

Figure 3. Quantitative real time PCR analysis of *ANGPT2* mRNA in bovine cotyledon-associated caruncles (dark gray bars) and caruncles from non-gravid horn (light gray bars). In AI gestations, *ANGPT2* gene showed higher expression in cotyledon-associated caruncles during days 30 and 35. The increase in transcript levels only occurred in cotyledon-associated caruncles at day 40 in IVF gestations.

Means with different superscripted letters are significantly different ($p<0.05$) at same gestational age. Asterisks characterize means with significant differences ($p<0.05$) between AI and IVF gestations. AI: artificial insemination; IVF: in vitro fertilization27

Figure 4. Quantitative real time PCR analysis of *GUCY1B3* mRNA in bovine cotyledon-associated caruncles (dark gray bars) and caruncles from non-gravid horn (light gray bars). Cotyledon-associated caruncles showed high expression of *GUCY1B3* mRNA at 30 days in AI gestations. Despite no statistical differences, this expression pattern remained until day 35. Gene mRNA expression significantly decrease in gravid horn at 40 days in AI gestations. *GUCY1B3* transcript levels did not vary between caruncles from gravid and non-gravid horns in IVF gestations. Means with different superscripted letters are significantly different ($p<0.05$) at same gestational age. Asterisks characterize means with significant differences ($p<0.05$) between AI and IVF gestations. AI: artificial insemination; IVF: in vitro fertilization28

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO: INFLUÊNCIA SOBRE FATORES ANGIOGÊNICOS E VASOATIVOS

RESUMO GERAL

Em bovinos, perdas reprodutivas ocorrem principalmente no período embrionário (0 – 42 dias), sendo desencadeadas principalmente por falhas na sincronização da comunicação materno-embrionária. O conceito (embrião e membranas extraembrionárias) desempenha um papel chave no controle do ambiente intrauterino, desencadeando a liberação de fatores parácrinos para sinalização gestacional e modulando a expressão de genes no endométrio materno que atuam na preparação da implantação e posterior início do desenvolvimento placentário. Apesar da produção *in vitro* de embriões se mostrar como uma ferramenta útil no aumento da produtividade de rebanhos, este método ainda apresenta lacunas no sucesso da eficiência reprodutiva. Este estudo objetivou analisar a expressão de genes envolvidos com a função vascular placentária em cornos uterinos gestantes e não gestantes de vacas primíparas submetidas à inseminação artificial (IA) e fertilização *in vitro* (FIV), buscando identificar o papel regulatório do embrião na expressão gênica endometrial e a influência da manipulação embrionária *in vitro* neste mecanismo. Para realização do estudo, amostras carunculares do corno gestante foram coletadas após a separação dos cotilédones fetais, ocorrendo nos dias 30 (n = 3), 35 (n = 8) e 40 (n = 3) de IA e 35 (n = 3) e 40 dias (n = 3) de FIV. Concomitantemente, carúnculas do corno uterino contralateral também foram coletadas. Todos os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a – 80° C, até o momento de extração do RNA. A partir de um microarranjo previamente realizado, quatro genes (*eNOS*, *GUCY1B3*, *EDNRB*, *ANGPT2*) envolvidos com a função vascular placentária foram selecionados para o estudo. Todas as amostras foram processadas pela técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), onde a análise dos resultados mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) em cornos gestantes de IA entre os 30 e 35 dias para os genes *EDNRB* e *ANGPT2*, e 30 dias para *GUCY1B3*. Nenhuma alteração nos níveis de expressão de

eNOS para IA foi observado. Uma resposta de transcrição tardia ocorreu aos 40 dias em cornos gestantes de FIV para os genes *eNOS*, *EDNRB* e *ANGPT2*, e nenhuma alteração significativa ($p < 0,05$) foi observada para *GUCY1B3*. Tendo em vista os aspectos observados, conclui-se que a expressão diferencial de genes em cornos gestantes possui relação direta com a presença do embrião, estando os mesmos genes sujeitos a modificações no padrão transcricional em virtude das adversidades impostas pela manipulação e cultura *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: função vascular, placenta, inseminação artificial, fertilização *in vitro*

ABSTRACT

Keywords: In cattle, reproductive loss occurs mainly embryonic period (0-42 days), and one of the major cause of this issue are failures in synchronization of maternal and embryonic communication. The conceptus (embryo and extraembryonic membranes) plays a key role in controlling intrauterine environment, leading to the release of paracrine factors for gestational signaling and modulating the expression of genes in maternal endometrium, leading up to implantation and subsequent early placental development. Despite of *in vitro* production of embryos proves to be a useful tool in increasing productivity of cattle, this method still has gaps in successful of reproductive efficiency. This study aimed to analyze the expression of genes involved with placental vascular function in gravid and non-gravid uterine horns of primiparous cows submitted to artificial insemination (AI) and *in vitro* fertilization (IVF), in order to identify the regulatory role of embryo on endometrial gene expression and the influence of *in vitro* embryonic manipulation on this mechanism. In this study, caruncular samples of the gravid horn were collected after the separation of fetal cotyledons, occurring on days 30 (n = 3), 35 (n = 8) and 40 (n = 3) AI and 35 (n = 3) and 40 (n = 3) days IVF. Caruncles of contralateral uterine horns were collected concomitantly. All tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Four genes (*eNOS*, *GUCY1B3*, *EDNRB*, *ANGPT2*) involved with placental vascular function were chosen for this study. All samples were processed by Quantitative Real Time PCR (qPCR), at where the analysis of results showed a significant increase ($p < 0.05$) in AI gravid horns between 30 to 35 days for both *EDNRB* and *ANGPT2* genes, while *GUCY1B3* was upregulated on gravid horns only at 30 days AI. Expression levels of *eNOS* did not changed in AI uterine tissues. Late transcription response occurred at 40 days IVF on gravid horns for *eNOS*, *EDNRB* and *ANGPT2*, and no significant alterations ($p < 0.05$) was observed for *GUCY1B3*. Considering the observed aspects, we conclude that the differential expression of genes on gravid horns has a direct relation with the presence of embryo, being these genes themselves liable to modifications in transcriptional pattern due to adversities imposed by manipulation and culture of *in vitro* embryos.

Key words: vascular function, placenta, artificial insemination, *in vitro* fertilization

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diversos fatores nutricionais, hormonais e imunológicos são requeridos durante o período de pré-implantação embrionária, sendo essenciais para o sucesso da implantação do embrião no endométrio e sinalização do reconhecimento materno gestacional nos mamíferos. No sistema de produção de ruminantes, a mortalidade embrionária consiste em um dos maiores problemas de cunho econômico, refletindo em taxas reduzidas de concepção e diminuição do número de filhotes em espécies múltiparas (DISKIN; MORRIS, 2008). Em vacas, a probabilidade de perda gestacional precoce por morte embrionária ocorre durante os dias um a 42 de gestação (FARIN et al., 2006), sendo o período de pré-implantação considerado como crítico para o desenvolvimento do embrião (LIMA; SOUZA, 2009; DESTRO et al., 2014). Perdas embrionárias e fetais representam cerca de 40% em vacas inseminadas artificialmente, embora a eficácia deste método reprodutivo possa chegar a 100% (DISKIN; MORRIS, 2008).

O Brasil ocupa uma posição de destaque na produção *in vitro* de embriões, atingindo cerca de 50% do total produzido mundialmente apenas no ano de 2005 (THIBIER, 2006; VARAGO et al., 2008). No entanto, ao menos três fatores são fundamentais para que a gestação por transferência de embriões seja bem sucedida: a receptividade do endométrio; boa qualidade do embrião ainda na fase de blastocisto; e sincronização de comunicação entre o endométrio e o embrião (SADEGHI, 2012). Em bovinos, apenas 30 a 40% dos oócitos imaturos atingem a fase de blastocisto entre os dias sete e oito pós-fertilização (RIZOS et al., 2008). Embora o desenvolvimento gestacional normal possa ser observado com transferência de embriões *in vitro*, diversas consequências adversas são relatadas ao feto e a placenta em decorrência da utilização deste método, dentre as quais a morte embrionária precoce, aborto, Síndrome de Bezerros Grandes, deformidades músculo-esqueléticas, crescimento anormal de órgãos e anormalidades da vasculatura e desenvolvimento placentário (FARIN et al., 2006). Além disso, alterações no padrão de expressão de genes também tem sido relatadas em resposta às condições subótimas impostas pela cultura *in vitro* de embriões (TESFAYE et al., 2004; LONERGAN et al., 2006).

A implantação embrionária tem início com a aderência do blastocisto à parede uterina, finalizando com a formação da placenta (HERINGTON; BANY, 2010). O diálogo estabelecido entre a mãe e o embrião pós-fertilização é crucial para a manutenção da gestação, resultando na sincronização entre o desenvolvimento embrionário e remodelamento do endométrio; diferentes fatores como os hormônios esteroides e peptídicos, prostaglandinas, citocinas e fatores de crescimento estão envolvidos na coordenação da comunicação gestacional (HASHIZUME, 2007). Fatores parácrinos secretados pelo conceito em desenvolvimento são fundamentais ao endométrio durante a progressão da implantação (HERINGTON; BANY, 2010). Em ratas, foi demonstrado que o conceito é capaz de exercer um efeito local na regulação da expressão de genes no endométrio durante o processo de decidualização (BANY; CROSS, 2006). O hCG é um importante sinalizador gestacional embrionário de humanos, sendo produzido pelo blastocisto logo após a descida do embrião pelo oviduto ao endométrio (RAHEEM, 2015). Em suínos, o conceito secreta o estrógeno como principal fator de reconhecimento gestacional materno, promovendo o sequestro e metabolismo de prostaglandina F₂-alpha (PGF) dentro do lúmen uterino e consequentemente prevenindo a luteólise (BAZER, 2013). Em contraste às demais espécies, o mecanismo de reconhecimento materno gestacional em equinos ainda não foi totalmente esclarecido (KLEIN; TROEDSSON, 2011). Porém, sabe-se que a restrição do movimento do conceito equino resulta em luteólise e falha da manutenção gestacional (MCDOWELL et al., 1988), e que presumivelmente essa migração embrionária no lúmen uterino sirva para sinalizar sua presença e recrutar secreções uterinas ao longo de todo o útero (SHARP, 2000).

Partindo para o desenvolvimento embrionário de bovinos, a mórula embrionária alcança o útero entre os dias quatro e seis após a concepção, e transforma-se em blastocisto no período denominado de compactação (BROOKS et al., 2014). O blastocisto é uma unidade funcional embrionária composta por uma massa celular interna e uma cavidade central (blastocelo) envolta por uma monocamada de trofotoderma (BROOKS et al., 2014). Durante os dias oito e 10, o blastocisto eclode da zona pelúcida para formação do conceito (embrião e membranas extraembrionárias associadas), que assumirá um formato estrutural esférico antes

do processo de alongamento embrionário (OESTRUP et al., 2009; OSTRUP et al., 2011; BROOKS et al., 2014). O conceito ovoide será formado entre os dias 12 a 14 (MADDOX-HYTTEL et al., 2003; BROOKS et al., 2014), com posterior alongamento e crescimento estrutural antes da implantação. O processo de alongamento do conceito promove a formação de uma estrutura filamentosa que ocupará os dois cornos uterinos por volta do dia 24 da gestação (BAZER et al., 2012), ao passo que o endométrio sofrerá modificações para adaptar a receptividade ao embrião na implantação e estabelecimento da gestação (FORDE et al., 2014).

O conceito em desenvolvimento necessita ser nutrido, uma vez que ainda não há o contato do trofoblasto com a circulação sanguínea materna (OSTRUP et al., 2011). O histotrofo é a primeira fonte de nutrientes do trofoblasto no período embrionário. É um fluido uterino luminal composto por uma mistura complexa de íons, proteínas, aminoácidos, lipídeos, citocinas, hormônios, fatores de crescimento e outras moléculas (SHIMIZU et al., 2010; FORDE et al., 2014) que são transportadas ou sintetizadas e secretadas pelo epitélio glandular e luminal uterino (SATTEFIELD et al., 2009; BAZER et al., 2011). Hipoteticamente, a composição do fluido luminal uterino histotrófico pode ser alterada para suportar o crescimento e sobrevivência do blastocisto até o processo de alongamento embrionário (SPENCER et al., 2014), podendo ser influenciada pela expressão de genes no epitélio luminal (EL) e/ou glandular (EG) endometrial estimulados pela progesterona (P4) ovariana e que posteriormente são influenciados por fatores estimulantes do próprio conceito (prostaglandina, interferon *tau*, cortisol) e do endométrio (prostaglandina, cortisol) (DORNIK et al., 2013; BROOKS et al., 2014; SPENCER et al., 2014).

Entretanto, é necessário que haja o silenciamento do receptor de progesterona (RPG) no EL e EG para que a P4 circulante atue sobre o RPG não silenciando nas células do estroma endometrial, aumentando assim a expressão do *fator de crescimento de fibroblasto 7 (FGF7)*, *FGF 10* e o *fator de crescimento do hepatócito (HGF)*, que ao se ligarem aos seus receptores no epitélio endometrial ou trofotoderma irão desencadear o mecanismo de sinalização celular responsável pela expressão de genes considerados fundamentais na receptividade uterina para implantação e desenvolvimento do conceito (BAZER et al., 2009; FORDE et al.,

2011; BAZER et al., 2013). Genes envolvidos na inibição da protease (*CST3*), eritropoiese e angiogênese (*HIF1A*, *HIF2A*), migração celular e adesão (*IGFBP1*, *LGALS15*) e transportadores moleculares (*SLC2A1*, *SLC5A11*, *SLC5A1*, *SLC7A1*, *SLC7A2*) são regulados pela P4 e interferons, enquanto genes que regulam cortisóis (*HSD11B1*), receptores de glicocorticoides (*NRC31*) e sintetizadores de prostaglandinas (*PTGS2*) são regulados pela P4, interferons e posteriormente PGs (BAZER et al., 2012).

Em ruminantes, o reconhecimento materno-embriônico ocorre quando o conceito sinaliza sua presença para a mãe (LIMA; SOUZA, 2009). Este mecanismo de sinalização acontece quando o conceito, ainda em processo de alongamento, secreta o hormônio Interferon *tau* (IFN- τ) no lúmen uterino, promovendo o efeito antiluteolítico responsável pela manutenção da gestação (BAZER et al., 2009; ANTONIAZZI et al. 2011; BAZER, 2013). O IFN- τ representa uma das cinco famílias das citocinas secretadas de interferons do tipo I (IFNs I), e é expresso exclusivamente por células mononucleares do trofotoderma de conceitos ruminantes no período de pré-implantação (DEMMERS, 2001; BAZER, 2013). É secretado em maior quantidade entre os dias gestacionais 15 a 17 (SANTOS et al., 2004), sendo o dia 16 considerado como dia de *reconhecimento materno gestacional* nos bovinos (FORDE et al. 2011).

Os receptores de IFNs I são compostos por duas subunidades denominadas IFNAR1 e IFNAR2 (BINELLI et al., 2001), e podem ser expressos em todos os tecidos corporais (ANTONIAZZI et al., 2011). Quando acoplado aos receptores, o IFN- τ irá atuar no mecanismo de sinalização celular promovida pelas proteínas *Janus Quinase ativada* (JAK) e proteínas transdutoras e ativadoras de sinais de transcrição (STAT), localizadas nas células epiteliais do endométrio (PLATANIAS, 2005). O IFN- τ induzirá a fosforilação das proteínas STAT pelas proteínas JAK (cascata JAK/STAT), formando assim o complexo ISGF3 (PLATANIAS, 2005; ANTONIAZZI et al., 2011). O ISGF3 inibirá a transcrição dos genes *receptor alfa de estrógeno* (*ESR1*) e *receptor de ocitocina* (*OXTR*), e é o único complexo capaz de migrar para o núcleo celular e de se ligar a elementos responsivos à estimulação por interferons (ISREs) no DNA, para posterior transcrição de genes estimulados pelo interferon (ISGs) (BINELLI et al., 2001; PLATANIAS, 2005) como o 2'-5'

'oligoadenilato sintetase 1 (*OAS1*), gene de resistência ao Myxovirus 2 (*MX2*), gene estimulado pelo interferon 15 (*ISG15*) (GREEN et al., 2010), fator regulatório de interferon 9 (*IRF9*), fator regulatório de interferon 2 (*IRF2*), dentre outros (BAZER et al., 2012).

O IFN- τ atuará de forma parácrina, silenciando a expressão dos genes *ESR1* e *OXTR* no epitélio glandular superficial e luminal uterino, inibindo assim a liberação pulsátil de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) pelo bloqueio do *OXTR* e impossibilitando a regressão do CL (BAZER et al., 2012; BROOKS et al., 2014). Entretanto, o IFN- τ não inibe a expressão da sintase de prostaglandina 2 (*PTGS2*) no útero (BROOKS et al., 2014), responsável por estimular a produção de PGF e PGE₂. O conceito em alongamento sintetiza e secreta mais PGs que o próprio útero, fazendo com que sua concentração seja maior em ovinos e bovinos grávidos quando comparados aos ruminantes cíclicos (BAZER et al., 2013). Tanto o IFN- τ quanto as prostaglandinas são fundamentais para o desenvolvimento do conceito, pois estimulam a expressão de genes no epitélio endometrial que promovem a proliferação, migração e aderência celular (*GRP*, *IGFBP1*, *LGALS15*, *SPP1*) e transporte de glucose (*SLC2A1*, *SLC2A5*, *SLC5A1*, *SLC5A11*) e aminoácidos (*SLC1A5*, *SLC7A2*) (BAZER et al., 2013; BROOKS et al., 2014).

A produção *in vitro* e transferência de embriões demonstram que o ambiente uterino materno não é necessário para que o IFN- τ seja expresso, embora desempenhe um papel importante no seu controle (ALBERTO et al., 2011; SANDRA et al., 2015). Essa expressão aparenta ser geneticamente programada pelo fato do IFN-T ser detectado *in vitro* após a fertilização, mas sua expressão torna-se maior em ovinos em meios de cultura na presença de tecido endometrial (DEMMERS et al., 2001). Para Alberto et al. (2011), a modulação do IFN- τ pode ser induzida por condições no meio de cultura associadas a presença de fatores biológicos presentes no soro fetal, ou ainda por motivos intrínsecos do próprio embrião. Araújo et al. (2005) constataram que a secreção de IFN- τ de embriões *in vitro* criopreservados é menor quando comparada a embriões frescos, sendo este fato atribuído aos danos nas células trofoblásticas provocados pela criopreservação. Ainda, embriões de melhor qualidade são capazes de produzir mais IFN- τ que embriões de baixa

qualidade, devido ao fato de possuírem menos células degeneradas (STOJKOVIC et al., 1995; ALBERTO et al., 2011).

O primeiro contato célula-célula entre o trofotoderma e EL é denominado de aposição (OSTRUP et al., 2011). Durante esta fase, as microvilosidades apicais que recobrem o trofotoderma são reduzidas, e ocorre uma adesão instável ao EL (BAZER et al., 2012). Para assegurar a aderência e posterior aposição, o EL promove a formação projeções citoplasmáticas interdigitais no próprio trofotoderma (SPENCER et al. 2004). O conceito ruminante desenvolve uma ampla superfície de contato com o LE, descartando assim a invasão profunda das células trofoblásticas no tecido uterino materno (NAKAYA; MIYAZAWA, 2015); tanto os tecidos carunculares quanto os intercarunculares participam da implantação (BAZER et al., 2012). Ainda por volta dia 19 gestacional, células binucleadas gigantes trofoblásticas (BNC) diferenciam-se dos trofoblastos mononucleares (SPENCER et al., 2004). Entretanto, tais células não participam da adesão ao EL; elas se fundem posteriormente com o as carúnculas no EL para formação dos placentomas (LEE; DEMAYO, 2014). Dentre suas funções destacam-se a formação sincício em compartimentos conceito-maternal para proteção imunológica do conceito e crescimento do placentoma e a síntese de CSH1 e P4, essenciais na fisiologia gestacional materna (BAZER et al., 2012).

Dois processos são requeridos no momento da adesão: a redução ou perda do *glycocalyx* no LE e o surgimento de moléculas celulares de adesão na superfície endometrial uterina (NAGAOKA et al, 2000). O *glycocalyx* é uma camada formada por carboidratos presente no trato reprodutivo feminino que agem impedindo a aderência do blastocisto no endométrio (BRAYMAN et al., 2004; LEE; DEMAYO, 2014). A MUC1 (Mucina 1) é uma glicoproteína transmembrana de alto peso molecular expressa na superfície apical do epitélio uterino, sendo um dos componentes do *glycocalyx* (BRAYMAN et al., 2004). Sua alta expressão inibe a aderência do blastocisto no endométrio (LEE; DEMAYO, 2014), enquanto sua perda é regulada pela progesterona em ovelhas (JOHNSON et al., 2001).

Por este mecanismo de perda, acredita-se que outras glicoproteínas sejam expostas na superfície endometrial, contribuindo para a aderência do conceito (SPENCER et al., 2004). As integrinas são glicoproteínas transmembranas formadas

por heterodímeros α e β que atuam como receptores de adesão das proteínas de matriz extracelular endometrial (NAGAOKA et al., 2000; LOPES et al., 2011), além de mediar importantes mecanismos de desenvolvimento celular, como proliferação, sobrevivência/apoptose, polaridade, motilidade e expressão e diferenciação genética (HYNES, 2002). Podem ser expressas no epitélio uterino e trofotoderma durante o ciclo estral e processo de implantação (BOWEN et al., 1996; NAGAOKA et al., 2000; MACINTYRE et al., 2002), e segundo Lopes et al. (2011), atuam como boas marcadoras da receptividade endometrial (LOPES et al., 2011).

A aderência ao endométrio ocorre por volta do dia 17, com o início da formação placentária (SAMMIN et al., 2009). Os ruminantes possuem placentas do tipo sinepiteliocorial, onde as células trofoblásticas se aderem à superfície celular epitelial uterina sem promover invasão profunda ao endométrio (MOFFETT; LOKE, 2006; NAKAYA; MIYAZAWA, 2015). Cerca de 80 a 120 placentomas são formados, oriundos da fixação das vilosidades fetais alantocoriônicas nas criptas carunculares (SCHAUSER et al., 2001). Essas vilosidades alantocoriônicas são denominadas de cotilédones fetais, sendo formadas pela fusão da área vascular do alantoide com a área avascular coriônica (SAMMIN et al., 2009).

O desenvolvimento vascular placentário é crucial para o crescimento fetal durante a gestação, e consiste em dois processos distintos. A primeira rede vascular é formada ainda no período embrionário, com a diferenciação *in situ* de células mesenquimais pluripotentes em angioblastos (HANAHAHAN, 1997), considerados células endoteliais. Este processo é denominado de vasculogênese, e é influenciado pelos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fibroblástico (FGF). Outro processo envolvido na formação vascular é a angiogênese, onde novos vasos são formados a partir de vasos preexistentes (LINARES et al., 2014) por brotamento ou intussuscepção. No brotamento, a matriz extracelular é degradada e as células endoteliais migram para dentro do espaço extracelular por quimiotaxia e se proliferam, formando brotos funcionais que estabelecem conexões com outros segmentos da rede capilar (DENIPOTI et al., 2006). Já na intussuscepção, células endoteliais de um único capilar se dividem de forma longitudinal até formarem um septo que originará dois vasos. Porém, para que haja o desenvolvimento de um

sistema vascular funcional outros fatores regulatórios e angiogênicos além do VEGF e FGF são requeridos (EKLUND; OLSEN, 2006).

eNOS (sintase do óxido nítrico endotelial)

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso (DIAS et al., 2011) produzido por conversão do aminoácido L-arginina por meio da reação catalítica de oxidação realizada pelas enzimas *sintase do óxido nítrico* (NOS) (TARRADE et al., 2014). Três isoformas de NOS com diferentes localizações, regulações, propriedades catalíticas e sensibilidade inibitórias são relatadas (TARRADE et al., 2014), sendo classificadas de acordo com seu mecanismo de ativação em NOS constitutiva e NOS induzível (TEIXEIRA, 2006). A NOS constitutiva é composta por duas isoformas: NOS neuronal (nNOS), produzida em tecidos neuronais; e NOS endotelial (eNOS), encontrada em células endoteliais, células musculares lisas e cardiomiócitos (PIAZZA et al., 2015). Já a NOS induzível (iNOS) pode ser expressa em macrófagos, neutrófilos e diversas células e tecidos (DIAS et al., 2011).

O NO é considerado um potente vasodilatador em células musculares lisas. Seu mecanismo de ação ocorre por meio da ativação da enzima guanilato ciclase e posterior acúmulo de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), responsável por mediar o relaxamento vascular (TEIXEIRA, 2006; KHALIL et al., 2015). Em células endoteliais, sua produção será induzida pela ativação do EDNRB (KAWANABE; NAULI, 2011) ou por receptores β -adrenérgicos (SILVA; ZANESCO, 2010), que irão estimular sua síntese através da eNOS. O VEGF e fator de crescimento placentário (PIGF) também induzem a produção da eNOS nos citotrofoblastos, com consequente produção de NO (NORIS et al., 2005; BHAVINA et al., 2014). De acordo com Dusse et al. (2013), o fato da eNOS estar acoplada a membrana celular endotelial proporciona a presença de altas quantidades de NO próximo a camada muscular de vasos e células sanguíneas circulantes, que rapidamente se distribui para célula muscular e lúmen vascular. Por sua vez, é necessário que haja a ligação da proteína calmodulina (CaM) com a eNOS em altas concentrações celulares de cálcio (Ca^{++}), proporcionando assim a ativação da enzima e consequente liberação do radical livre (PIAZZA et al., 2015).

O NO é essencial para manutenção da gestação, pois participa dos processos iniciais de desenvolvimento embrionário, implantação e da regulação do fluxo sanguíneo placentário (MAUL et al., 2003). Nos mamíferos, o desenvolvimento da placenta e de suas respectivas funções ocorre através do crescimento do leito vascular e do aumento do fluxo sanguíneo do útero e cordão umbilical; este processo, por sua vez, é controlado pela ação de vários peptídeos durante os estágios iniciais e finais da gravidez (GRAZUL-BISLKA et al., 2014). Em ruminantes, tanto o gene *EDNRB* quanto *eNOS* estão envolvidos na regulação vascular da placenta para manutenção da gestação, além da participação de outros fatores de crescimento do leito vascular como o *VEGF* e seu receptor (*FLT1*), angiopoietina-1 (*ANGPT1*), angiopoietina-2 (*ANGPT2*), fator de crescimento fibroblástico básico (*FGF2*), guanilato ciclase solúvel (*GUCY1B3*) e outros componentes do sistema endotelina (BOROWICZ et al., 2007; HAYASHI et al., 2012).

Diversos outros mecanismos fisiológicos são mediados pelas NOS e pelo NO. A pré-eclâmpsia é uma desordem gestacional hipertensiva responsável por severos índices de morbidade e mortalidade materna e fetal em humanos, sendo caracterizada por uma resposta inflamatória materna consequente a placentação anormal (DUHIG; SHENNAN, 2015; WALKER et al., 2015). Estudos sugerem que a redução dos níveis de L-arginina na placenta auxilia no desenvolvimento da pré-eclâmpsia, pois com a diminuição deste aminoácido a *eNOS* será redirecionada a produzir NO e superóxido (O_2^-); consequentemente, a reação destas duas moléculas resulta na formação do ânion inativo peroxinitrito ($ONOO^-$), reduzindo a meia vida do NO disponível e provocando estresse oxidativo e perfusão inadequada da placenta (NORIS et al., 2004; NORIS et al., 2005; KIM et al., 2006; KHALIL et al., 2015). Em aspectos reprodutivos, a *eNOS* irá participar dos processos de crescimento e atresia folicular ovariano, além de ser expressa durante os períodos de crescimento, diferenciação e regressão do corpo lúteo em ovinos (GRAZUL-BILSKA et al., 2006). Ainda, O NO atua nos processos de desenvolvimento neoplásico em humanos. De acordo com Fukumura et al. (2006), o efeito do NO na inibição ou progressão neoplásica irá depender da localização e atividade das NOS, bem como da concentração, duração de exposição e sensibilidade celular ao NO, estando a expressão da *eNOS* associada a tumores de células vasculares endoteliais.

GUCY1B3 (guanilato ciclase, solúvel, beta 3)

Guanilato ciclases solúveis (sGC) são proteínas heterodiméricas de subunidades homólogas α e β (PUROHIT et al., 2013) importantes no processo de regulação fisiológica do tônus vascular, da pressão sanguínea e de mecanismos do sistema neuronal (DENNINGER; MARLETTA et al., 1999; POULOS, 2006; NIMMEGEERS et al., 2007). Inicialmente essas proteínas foram detectadas em mamíferos, mas podem ser encontradas em peixes (*Oryzias latipes*) (MIKAMI et al., 1998) e insetos (*Drosophila melanogaster*) (SHAH; HYDE, 1995). Suas isoformas são células específicas, sendo classificadas em subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$ e $\beta 2$ (HARTENECK et al., 1991), sendo as subunidades $\alpha 3$ e $\beta 3$ isoformas homólogas humanas de $\alpha 1$ e $\beta 1$ encontradas em ratos e bovinos (ZABEL et al., 1998). Por sua vez, o gene *GUCY1B3* é responsável por codificar a subunidade β (NCBI, 2015). Segundo Cary et al. (2012), a subunidade $\beta 1$ de rato faz parte de uma enorme família conservada em eucariotas superiores, sendo constituída de 620 aminoácidos e com a capacidade de formar um heterodímero homólogo com $\alpha 1$ (isoforma $\alpha 1\beta 1$), obrigatório na atividade catalítica da sGC (ZHU et al., 2011).

A sGC é considerada como o único receptor conhecido do NO, que irá funcionar como um sinalizador (ZHU et al., 2011). O NO irá difundir-se através das bicamadas lipídicas para as células adjacentes, formando o complexo de ativação com a sGC (CARY et al., 2006). É através da ligação do NO com o domínio heme ferroso da subunidade $\beta 1$ que irá ocorrer a reação catalítica (na presença de Mg^{2+}) responsável por converter o 5'-trifosfato de guanosina (GTP) em 3',5- monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) (POULOS et al., 2006; PUROHIT et al., 2013; NCBI, 2015), essencial em diversos processos fisiológicos. O cGMP é um importante indutor da vasodilatação (KEMP-HARPER; SCHMIDT, 2009).

Cada subunidade de sGC é composta por 4 tipos distintos de domínios: região de ligação heme N-terminal (H-NOX); domínio central (PAS-like domínio), que contribui para dimerização; hélice anfipática; domínio catalítico C-terminal, responsável pelo reconhecimento do substrato e atividade catalítica da sGC (CARY et al., 2006; DERBYSHIRE; MARLETTA, 2012; WANG et al., 2012). De acordo com Poulos (2006), a heme liga-se somente a região H-NOX da subunidade β , pois há apenas

uma heme para cada heterodímero; entretanto, o domínio catalítico é composto por duas subunidades (α e β) na região C-terminal, sendo necessário que haja a co-expressão de ambas para que ocorra a atividade da sGC (DENNINGER; MARLETTA, 1999).

O 17- β estradiol (E_2) é um hormônio esteroide ovariano produzido a partir do colesterol e capaz de regular o comportamento sexual, aumentar a motilidade uterina e promover a atividade de secreção de todo o trato reprodutivo feminino (SZÓSTEK et al., 2014). Em um estudo realizado por Johnson et al. (2006), a expressão do gene *GUCY1B3* aumentou na carúncula e áreas intercarunculares na presença do E_2 , além de estar positivamente relacionada com a expressão de *eNOS* e de outros genes envolvidos na angiogênese na presença do estrogênio, o que faz do E_2 um dos principais reguladores da expressão de fatores angiogênicos endometriais em ovelhas (JOHNSON et al., 2006). Em outro estudo, Redmer et al. (2005) relataram que a expressão da *eNOS* foi significativamente relacionada com a expressão de seu receptor, demonstrando a importância do *GUCY1B3* na regulação da angiogênese placentária. Ainda, o aumento na expressão do *GUCY1B3* na carúncula de ovelhas foi observado por Borowicz et al. (2006) durante o último terço de gestação, enfatizando a participação do gene durante o desenvolvimento vascular placentário.

EDNRB (receptor de endotelina tipo B)

As endotelinas são peptídeos vasoconstritores envolvidos no mecanismo de diversas funções fisiológicas e fisiopatológicas vasculares, sendo descritos em processos de hipertensão, arteriosclerose, desordens cardíacas, pulmonares e renais (KHIMJI; ROCKEY, 2010). Esses peptídeos são classificados em quatro tipos: endotelina-1 (ET-1); endotelina-2 (ET-2); endotelina-3 (ET-3) (ZANATTA et al., 2008) e um constritor vasoativo intestinal (SAIDA; MITSUI; ISHIDA, 1989), caracterizados por distintas estruturas e atividades farmacológicas (INOUE et al., 1989).

A ET-1 é um peptídeo composto por 21 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína, responsáveis por estabelecer duas pontes intramoleculares dissulfureto que formam uma estrutura semi-cônica de formato inusual e isoformas de ET-2 e ET-3

(FLORES VALDEZ et al., 2013). É o único dos quatro peptídeos produzido por células endoteliais podendo ser expresso ainda por astrócitos, células de Sertoli, células endometriais, miofibroblastos, cardiomiócitos, células mesangiais e leucócitos (KHIMJI; ROCKEY, 2010; CHOI et al., 2011; FLORES VALDEZ et al., 2013). Durante seu processo de biossíntese, a ET-1 é inicialmente transcrita e traduzida em pré-proendotelina-1 (203 aminoácidos) através da regulação de fatores físicos, bioquímicos e humorais, sendo posteriormente convertida em *big*-endotelina-1 pela ação das endopeptidases; o precursor *big*-endotelina-1 é então clivado pela enzima conversora de endotelina (ECE) no peptídeo ET-1, que irá ativar os receptores do tipo A (EDNRA) e B (EDNRB) (BRIDGES et al., 2011; HARRISON-BERNARD et al., 2013).

Esses receptores pertencem a superfamília da proteína G em diversos tecidos, e suas estruturas de aminoácidos são idênticas em aproximadamente 50%, sendo altamente conservadas entre os mamíferos (LEVIN, 1995). O EDNRA é composto por 427 aminoácidos (HAENDLER et al., 1992) e expresso principalmente em células musculares lisas, desencadeando ações vasoconstritoras da ET-1 (FROMMER; MÜLLER-LADNER, 2008). O EDNRB tem sua maior expressão em células endoteliais, onde sua ativação induz a produção de um potente vasodilatador de células musculares lisa – o óxido nítrico (ON) (LEVIN, 1995; KAWANABE; NAULI, 2011). Este receptor do tipo B é composto por uma cadeia de 442 aminoácidos (HAENDLER et al., 1992), e quando ativado em outros órgãos e tecidos, promove efeitos adversos. Oposto ao EDNRA, possui afinidade de ligação semelhante para todos os tipos de endotelina (ET-1, ET-2 e ET-3), além de criar um mecanismo regulatório próprio de produção ao promover a síntese de ET-1 (FROMMER; MÜLLER-LADNER, 2008). Embora possam ser expressos por mecanismos fisiológicos normais específicos para cada tipo celular, a expressão desses receptores também pode ser induzida por processos patológicos que estimulem a produção de ET-1.

Diversos efeitos fisiológicos são desencadeados pelo EDNRB, tais como o controle da pressão sanguínea basal e tônus vascular (SCHNEIDER et al., 2007); aumento da natriurese e diurese nos rins; regulação da concentração de ET-1 circulante e indução da liberação de prostaglandinas (FROMMER; MÜLLER-

LADNER, 2008) e outros fatores vasodilatadores (KOWALCZYK et al., 2014). Em células tumorais, a expressão de *EDNRB* encontra-se aumentada, estando correlacionada à proliferação, migração e invasão tumoral (BAGNATO; NATALI, 2004; KHODOROVA et al., 2009). Já em células trofoblásticas, Cervar-Zivkovic et al. (2011) constataram que o *EDNRB* promove um efeito proliferativo e invasivo durante o primeiro trimestre de gravidez, sendo expresso tanto na parte proximal quanto distal de células colunares. Em estudos anteriores, a expressão do receptor do tipo *B* em tecidos vilosos e trofoblastos durante o primeiro e terceiro trimestre de gestação também foi relatada por Cervar et al (2000), reforçando a hipótese do papel do *EDNRB* como um fator de crescimento placentário em humanos. Em bovinos, a expressão do mRNA de *EDNRB* em carúnculas e cotilédones durante a gestação e pós-parto foi relatada (TAGAKI et al., 2008), assim como a participação dos outros componentes do sistema endotelina e *sintase* do óxido nítrico (NOS), sugerindo a participação deste receptor na regulação de funções celulares e vasculares uteroplacentárias (HAYASHI et al., 2012).

ANGPT2 (Angiopietina 2)

A família angiopietina (ANGPT) é composta por quatro ligantes endógenos do receptor Tie-2: *ANGPT1*, *ANGPT2* e pelos genes ortólogos *ANGPT3* (ratos) e *ANGPT4* (humanos) (LINARES et al., 2014). Estruturalmente, essas glicoproteínas secretadas são formadas por um domínio N-terminal de *super* agrupamento, um domínio de hélice espiralada, uma região de ligação e um domínio C-terminal de fibrinogênio, necessário para ligação do receptor Tie-2 (DAVIS et al., 1996; MOSS, 2013). Já o receptor Tie-2 faz parte da família de receptores tirosina quinase, sendo composto por uma estrutura extracelular N-terminal de dois domínios tipo imunoglobulina; três domínios de fatores de crescimento epidermal seguidos por outro domínio do tipo imunoglobulina; três domínios de fibronectina tipo III; um domínio transmembrana e por fim, um domínio tirosina quinase responsável pela transdução do sinal intracelular (FAGIANI; CHRISTOFORI, 2013). O Tie-2 é expresso em células endoteliais e hematopoiéticas jovens (LINARES et al., 2014).

O gene *ANGPT1* codifica uma proteína de 498 aminoácidos (CHARNOCK-JONES, 2002), sendo amplamente expressa em células periendothelias na vasculatura quiescente (BRINDLE et al., 2006) do embrião e em adultos (MAISONPIERRE et al., 1997). Esta glicoproteína possui uma forte ligação com o receptor Tie-2, sendo responsável por induzir a fosforilação da tirosina quinase (MOSS, 2013). A *ANGPT2* também se liga ao receptor Tie-2 estimulando sua fosforilação, porém de uma forma mais fraca e com menor afinidade quando comparada a *ANGPT1* (BOGDANOVIC et al., 2006). Por esta razão, é considerada apenas como um agonista parcial do receptor Tie-2 em células endoteliais (YUAN et al., 2009). O gene *ANGPT2* codifica uma proteína de 496 aminoácidos, apresentando ainda 60% de homologia com o *ANGPT1* (MAISONPIERRE et al., 1997). É sintetizada por células endoteliais (EKLUND; SAHARINEN, 2013), e apesar de ser expressa no embrião, no adulto encontra-se restrita aos ovários, útero e placenta (MAISONPIERRE et al., 1997).

Por outro lado, a *ANGPT2* atua como um antagonista de sinalização do complexo *ANGPT1* – Tie-2, resultando na redução da proteção contra a apoptose de células endoteliais mediada pela *ANGPT1* (YUAN et al., 2009). Mas ao contrário do que se pensa, esta inibição não irá bloquear a proliferação celular endotelial nem a angiogênese; irá facilitá-la (HANAHAHAN, 1997). De acordo com Moss (2013), ao passo que o complexo *ANGPT1* – Tie-2 promove a integridade da junção interendotelial e a supressão de genes inflamatórios, a *ANGPT2* é descrita como um inibidor induzido da quiescência endotelial. Ainda, ao bloquear a sinalização do complexo *ANGPT1* – Tie-2, a *ANGPT2* irá promover a exposição do endotélio a outros fatores angiogênicos (FAM et al., 2003). Assim, na presença do VEGF, a *ANGPT2* irá induzir a migração e proliferação celular endotelial que culminará com o processo da angiogênese, enquanto que na ausência deste fator de crescimento, irá promover a regressão dos vasos sanguíneos (HANAHAHAN et al., 1997; FAM et al., 2003; FAGIANI; CHRISTOFORI, 2013).

A expressão placentária de *ANGPT2* em humanos pode ser até 400 vezes maior quando comparada a expressão do *ANGPT1* durante o primeiro trimestre da gestação, assim como demonstrado Geva et al. (2002). Para os autores, essa diferença de expressão placentária pode estar relacionada ao fato do *ANGPT2* atuar

no processo de remodelamento dos vasos sanguíneos fetais, resultando no aumento do tamanho placentário para que haja um melhor aproveitamento do consumo de oxigênio e das demandas metabólicas fetais durante o seu período de desenvolvimento (GEVA et al., 2002). Assim como o VEGF, o ANGPT2 estimula a síntese de DNA pelos trofoblastos, além de estimular ainda a liberação de NO por essas células (DUNK et al., 2000). Utilizando a hibridização *in situ*, a proteína da *ANGPT2* foi inicialmente localizada nos sinciciotrofoblastos, com menor extensão nas camadas citotrofoblásticas das vilosidades placentárias (SAVEL et al., 2008). Nos primatas, sua expressão pode estar associada à indução da remodelação vascular materna, uma vez que altos níveis de proteína de *ANGPT2* foram detectadas exclusivamente em células endoteliais de vasos maternos durante o início da gestação (WULFF et al., 2002).

OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo analisar a expressão de genes considerados fatores angiogênicos e vasoativos em cornos gestantes e não gestantes durante a placentação bovina, comparando os resultados entre gestações por inseminação artificial e fertilização de embriões *in vitro*. Como hipótese ao papel regulatório embrionário na expressão gênica endometrial, este trabalho objetiva ainda compreender o papel do embrião na coordenação da transcrição de genes envolvidos com a regulação da função vascular placentária no início gestacional.

**CAPÍTULO 1 – MODULATION OF CARUNCULAR GENE EXPRESSION BY
BOVINE EMBRYO DURING PLACENTATION: INFLUENCY ON ANGIOGENIC
AND VASOACTIVE FACTORS**

¹Manuscrito submetido à revista Genetics and Molecular Biology

**Modulation of Caruncular Gene Expression by Bovine Embryo during Placentation:
Influency on Angiogenic and Vasoactive Factors**

**Laysa Lindaura Lau Rocha Cordeiro^{1*}; Kaetillyn Araújo Diniz da Silva¹; Danila
Barreiro Campos¹**

1. Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade
Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil.

*Corresponding author.

Email: laysallrc@gmail.com

Telephone number: +5582996247795

Corresponding author: Laysa L L R Cordeiro, Departamento de Ciências Veterinárias, Centro
de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil, CEP 58.397-
000.

Abstract: Adequate maternal-embryonic communication and placental vascular development and function are both essential to guarantee the success of gestation. Embryo factors modulate endometrial gene expression during placental establishment. We hypothesized that the embryo plays a regulatory role on the expression of angiogenic and vasoactive factors during placentation, and that this orchestral mechanism may be negatively influenced by manipulation and culture environment during *in vitro* fertilization. Caruncular samples from gravid and non-gravid horns of cows were collected on days 30, 35 and 40 after artificial insemination (AI) and days 35 and 40 after *in vitro* fertilization (IVF). Expression of *eNOS*, *GUCY1B3*, *EDNRB* and *ANGPT2* mRNA was assessed by real time PCR. Both *EDNRB* and *ANGPT2* were more expressed in cotyledon-associated caruncles from days 30 to 35 in AI gestations, while *GUCY1B3* transcript showed higher expression in caruncles from gravid horn only at 30 days. In IVF pregnancies, higher levels of *EDNRB*, *ANGPT2* and *eNOS* gene expression occurred in cotyledon-associated caruncles at 40 days of gestation. These results indicate that the embryo modulates uterine gene expression during placentation, and that the process of embryo manipulation and culture during *in vitro* fertilization may alter the embryo's capability of control the uterine microenvironment during placentation.

Key words: vascular development, placenta, artificial insemination, *in vitro* fertilization

Introduction

Different mechanisms of maternal-fetal communication for recognition and maintenance of pregnancy were established on mammalian species, being very important even in embryonic period. Embryo implantation is a determinant factor in gestational establishment, initiating with conceptus adhesion in endometrium and ending on placental formation (McConaha et al., 2011). During this period, a compromised survival of embryo may occur, leading to one of the major causes of economic losses in all ruminant production systems (Diskin and Morris, 2008). The conceptus and endometrium interact reciprocally, being influenced by progesterone and placental hormones in pre and post implantation (Spencer et al., 2008). In ruminants, failures in maternal-embryo signaling communication are believed to be the major cause of embryonic death, resulting in reproductive flaw (Lima and Souza, 2009).

Embryonic development, implantation and formation of a functional placenta are key factors in pregnancy establishment (Guzeloglu-Kayisli et al., 2009). Paracrine factors secreted by the elongating conceptus are important mediators of antiluteolytic effects (Ealy et al., 2010), implantation and placentation (Herington and Bany, 2009). The endometrium undergoes to intense morphological and functional changes in response to these factors, all at once that the presence of conceptus modifies the endometrial gene expression even at early gestational period (Kim et al., 2012).

Placental development and function are largely dependent on vessel formation in both fetal and maternal compartments (Reynolds and Redmer, 1995). Vascular formation in the placenta involves the coordinated processes of vasculogenesis and angiogenesis requiring the interaction of several angiogenic and vasoactive factors, including endothelin and

angiopoietin systems and nitric oxide complex (Grazul-Bilska et al., 2010; Grazul-Bilska et al., 2011; Hayash et al., 2012). Embryo death have been related to reduction in vascular development of placenta in early stages of gestation (Galabova-Kovacs et al., 2006). Pregnancy rates may be even lower when embryos produced by *in vitro* fertilization are compared to embryos obtained by artificial insemination due to embryo manipulation and culture; these fetal losses possibly are related to failures in the development of membranes and placental vascular system between days 30 to 90 of gestation (Farin et al., 2006). Several placental flaws have been reported in cattle following *in vitro* fertilization, including decrease in the number of placentomes, reduction of placental efficiency (Miles et al., 2005) and increase of placental weight and volume (Miles et al., 2004).

Nitric oxide (NO) is a potent endothelial vasodilator synthesized by nitric oxide synthases (NOS). Three isoforms of NOS are described: neuronal NO synthase (nNOS or NOS1), inducible NO synthase (iNOS or NOS2) and endothelial NO synthase (eNOS or NOS3) (Alderton et al., 2001; Dias et al., 2009). Endothelial cells are the main source of eNOS, which is primarily activated via calcium-induced (Ca^{2+}) calmodulin (CaM) (Roviezzo et al., 2007; Rafikov et al., 2011). eNOS is expressed in placental tissues since early stages of pregnancy, promoting NO synthesis which results in a consequent regulation of placental vasodilatation (Krause et al., 2011).

In turn, NO perform its effect on stimulating the receptor soluble guanylate cyclase 1, beta 3 (GUCY1B3) (Borowicz et al., 2007), hence inducing 3', 5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) production (Nakane, 2003). Soluble guanylyl cyclase (sGC) are cytoplasmic molecules consisting of α and β subunits and four isoforms (Li et al., 2014). This transduction signaling of NO and cGMP leads to different physiological effects as visual

transduction, intestinal ion transport, platelet function and smooth muscle relaxation (Tousoulis et al., 2012).

Angiopoietins are one of the major angiogenic factors described, acting as endogenous ligands of Tie-2 tyrosine kinase receptor. Angiopoietin-1 (ANGPT1) has high binding affinity to Tie-2 receptor, leading to a strong signal (Moss, 2013) which results in induction of endothelial cell survival, vascular leakage inhibition and reduction of vascular inflammation (Fukuhara et al. 2009). Angiopoietin-2 (ANGPT2) is a low affinity ligand of Tie-2 receptor, and acts as an antagonist to the ANGPT1 Tie-2 binding (Yuan et al, 2009). In opposite effect to ANGPT1, ANGPT2 inhibits endothelial quiescence and promotes the destabilization of endothelial cells adhesion (Moss, 2013), exposing the endothelium to others angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) (Hanahan et al., 1997; Fam et al., 2003).

Endothelin system is composed by three peptides of 21 amino acids, isoforms of converting enzymes and two G-protein-coupled receptors (Montrezor et al, 2015). In vascular smooth muscle cells, endothelin receptor B (EDNRB) has a potent vasoconstrictor effect, while on endothelial cells this receptor acts as a vasodilator molecule resulting in the release of NO and prostacyclin (Cervar et al., 2000; Frommer and Müller-Ladner, 2008).

Considering that the embryo may regulate the endometrial expression of genes involved in placental vascular development and function and that this mechanism may be altered following embryo in vitro production, the aim of this study was to investigate the role of bovine embryo in the endometrial expression of angiogenic and vasoactive factors during placentation, as well as to analyze the influence of *in vitro* fertilization in this process.

Material and Methods

Animal Tissue Sampling

All experimental procedures involving the use of animals were approved by Ethics Committee on Animal Use of the Biotechnology Center (CEUA - CBiotech) of the Federal University of Paraíba. Caruncular tissues from gravid horn were collected from pregnant primiparous cows (*Bos indicus*) submitted to artificial insemination (AI) or transfer of embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF) using *B. indicus* male sex-sorted semen. Samples were collected at days 30 (n = 3), 35 (n = 3) and 40 (n = 3) after AI and days 35 (n = 3) and 40 (n = 3) after IVF. Caruncular sampling occurred after separation of the weakly associated cotyledons. Caruncles from contralateral uterine horn were collected simultaneously. All samples were frozen in liquid nitrogen and stored at - 80 °C until RNA extraction.

RNA Extraction, Purification and Reverse Transcription

Caruncular tissues were homogenized and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). DNase I (Qiagen, Valencia, CA) treatment was performed to avoid contamination by genomic DNA. Concentration and purity of the RNA samples were accessed by absorbance readings at 260 and 280 nm in Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). RNA integrity was verified on agarose gel followed by analysis in the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Only samples with RIN ≥ 8 were used in the experiments. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed

with the SuperScript III kit and oligo-dT primer (Invitrogen, Carlsbad, CA). All procedures were conducted according to the manufacturers' recommendations.

Gene Selection

Genes were selected from a microarray previously performed comparing gene expression of caruncles from gravid and non-gravid horns obtained by AI at 35 days of gestation (Papa, PC et al., unpublished data). Data from microarray generated a list of 149 differentially expressed genes, from these, 114 were upregulated and 35 were downregulated in caruncles from pregnant horn (± 1.5 -fold, $p < 0.05$). The differentially expressed gene list was analyzed in Ingenuity Pathway Analysis 7 software (IPA, Ingenuity Systems, San Francisco, CA; <http://www.ingenuity.com/>). From this analysis, three genes related to placental vasculogenesis and angiogenesis were selected.

All three selected genes were upregulated in caruncles from gravid horn: endothelin receptor B (*EDNRB*), a type of G-protein-coupled receptor that can be found in plasma membrane and shown an increase of 2.4 fold in gene expression; angiopoietin 2 (*ANGPT2*), a growth factor present on extracellular space with a 2.2 fold increased in gene expression, and guanylate cyclase 1 soluble beta 3 (*GUCY1B3*), a cytoplasm-located enzyme with an 1.8 fold increased in expression. In addition, although not differentially expressed, endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) gene was selected considering the importance of the nitric oxide in placental angiogenesis and vascular regulation.

Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Analysis of *eNOS*, *GUCY1B3*, *EDNRB* and *ANGPT2*

The mRNA expression of *eNOS*, *GUCY1B3*, *EDNRB* and *ANGPT2* was analyzed in caruncles from gravid and non-gravid horns. Tubulin beta (*TUBB*) was used as endogenous control, and all oligonucleotides were obtained from bovine sequences previously published (Table 1). Quantitative Real Time PCR (qPCR) was performed using MxPro – Mx3005P v4.10 Build 389, Schema 85 (Stratagene®, United States). All qPCR reactions used Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix with Low ROX (Agilent Technologies). Amplification conditions were 3 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 10 (*eNOS*, *GUCY1B3* and *TUBB*) or 20 (*ANGPT2* and *EDNRB*) seconds at 95°C and 20 seconds at 60°C; 1 minute at 95°C; 30 seconds at 55°C and finally 30 seconds at 95°C. Analysis of melting curve enabled the assessment of qPCR products' specificity. Samples were run in triplicate for each sample, and the relative quantification (target gene/endogenous control) determined its expression. Data were normalized to a calibrator sample using the $\Delta\Delta C_t$ method with correction for amplification efficiency (Pfaffl, 2001).

Table 1. Sequences of primers used for the quantitative PCR.

Genes	qPCR Primers (5'-3')	GenBank Number	Product Size
<i>eNOS</i>	>CTTTAAGGAAGTGGCCAACG <CAGAGGCGTACAGGATGGTT	NM_181037.3	95 bp
<i>EDNRB</i>	>AGCTGGTGCCTTTTCATTCAG <ATCCGACTCCAAGAAGCAA	D90456.1	104 bp
<i>ANGPT2</i>	>CTCACAAATGCTCACAGGA <TTTGTGTTCTGCCTCTGTGG	NM_001098855.1	91 bp
<i>GUCY1B3</i>	>TGACAGGGATCTTGTGGTCA <ACAGACAGGAGGCTGCAGTT	NM_174641.1	90 bp
<i>TUBB</i>	>CAGCAAGATCCGTGAAGAGT <ACCAGCTGATGGACAGAGAG	BT030522.1	123 bp

= forward; < = reverse

Statistical Analyses

Data were statistically analyzed to compare relative gene expression between cotyledon-associated caruncles and non-gravid horns at same gestational age and relative gene expression between AI and IVF pregnancies at same gestational age. Statistical analyses used unpaired bilateral t-test or ANOVA followed by Tukey test to compare means. Significant differences were considered when $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 6.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Expression of *eNOS* mRNA did not vary between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn from days 30 to 40 in AI gestations. However, higher *eNOS* transcript levels were observed in cotyledon-associated caruncles from IVF gestations at day 40 (Figure 1).

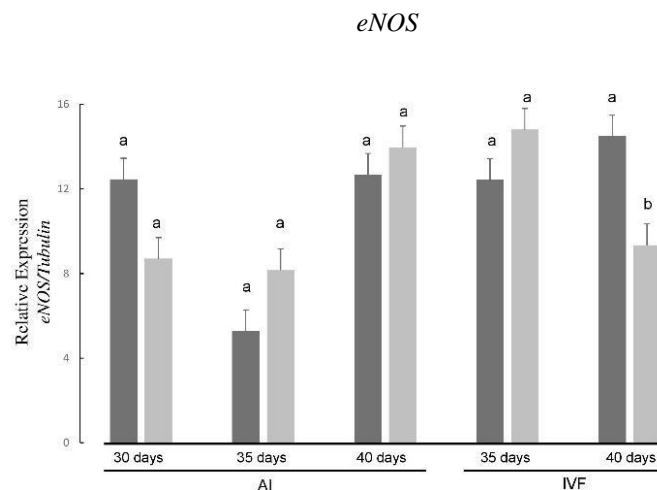


Figure1. Quantitative real time PCR analysis of *eNOS* mRNA in bovine cotyledon-associated caruncles (dark gray bars) and caruncles from non-gravid horn (light gray bars). *eNOS* mRNA expression did not vary between caruncles from gravid and non-gravid horns from days 30 to 40 in AI gestations; however, the gene was downregulated in caruncles from non-gravid horns at day 40 of IVF gestations. Means with different superscripted letters are significantly different ($p < 0.05$) at same gestational age. Asterisks characterize means with significant differences ($p < 0.05$) between AI and FIV gestations. AI: artificial insemination; FIV: in vitro fertilization.

Cotyledon-associated caruncles showed a higher expression of *EDNRB* and *ANGPT2* between 30 to 35 days in AI gestations. The increase in mRNA levels observed at 30 and 35 days in caruncles of the gravid horn in AI gestations was only observed at day 40 in animals undergoing IVF for both *EDNRB* and *ANGPT2* (Figures 2 and 3).

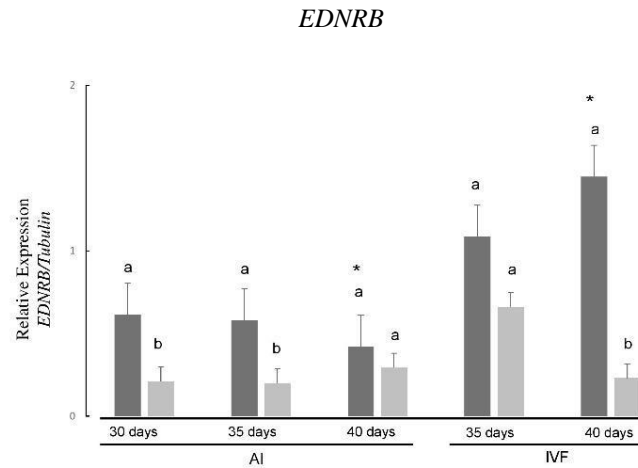


Figure 2. Quantitative real time PCR analysis of *EDNRB* mRNA in bovine cotyledon-associated caruncles (dark gray bars) and caruncles from non-gravid horn (light gray bars). *EDNRB* gene showed higher expression in cotyledon-associated caruncles during days 30 and 35 of AI gestations. The gene was upregulated in cotyledon-associated caruncles at day 40 in IVF gestations. Means with different superscripted letters are significantly different ($p < 0.05$) at same gestational age. Asterisks characterize means with significant differences ($p < 0.05$) between AI and FIV gestations. AI: artificial insemination; FIV: in vitro fertilization.

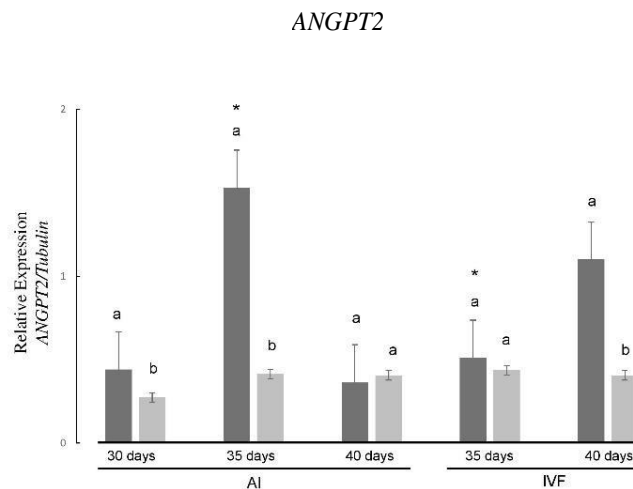


Figure 3. Quantitative real time PCR analysis of *ANGPT2* mRNA in bovine cotyledon-associated caruncles (dark gray bars) and caruncles from non-gravid horn (light gray bars). In AI gestations, *ANGPT2* gene showed higher expression in cotyledon-associated caruncles during days 30 and 35. The increase in transcript levels only occurred in cotyledon-associated caruncles at day 40 in IVF gestations. Means with different superscripted letters are significantly different ($p < 0.05$) at same gestational age. Asterisks characterize means with significant differences ($p < 0.05$) between AI and FIV gestations. AI: artificial insemination; FIV: in vitro fertilization.

GUCY1B3 mRNA expression was increased in cotyledon-associated caruncles of artificial inseminated animals at 30 day of gestation. Levels of expression were kept higher caruncles from gravid horn until 35 days of pregnancy, with a reduction in *GUCY1B3* expression occurring at 40 days of gestation. *GUCY1B3* transcript abundance did not vary between caruncles from gravid and non-gravid horns in IVF gestations (Figure 4).

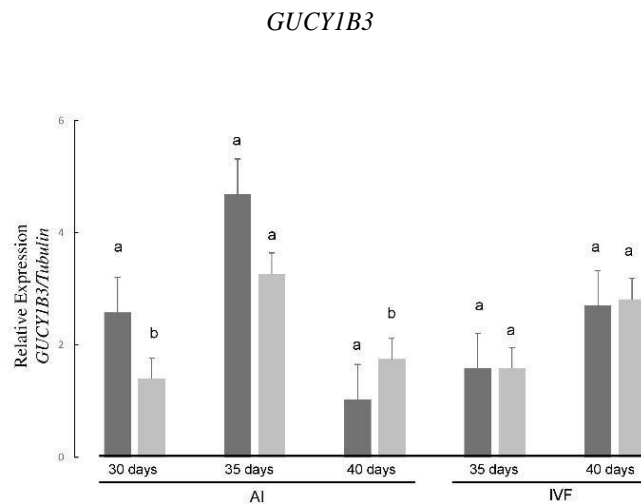


Figure 4. Quantitative real time PCR analysis of *GUCY1B3* mRNA in bovine cotyledon-associated caruncles (dark gray bars) and caruncles from non-gravid horn (light gray bars). Cotyledon-associated caruncles showed high expression of *GUCY1B3* mRNA at 30 days in AI gestations. Despite no statistical differences, this expression pattern remained until day 35. Gene mRNA expression significantly decrease in gravid horn at 40 days in AI gestations. *GUCY1B3* transcript levels did not vary between caruncles from gravid and non-gravid horns in IVF gestations. Means with different superscripted letters are significantly different ($p < 0.05$) at same gestational age. Asterisks characterize means with significant differences ($p < 0.05$) between AI and FIV gestations. AI: artificial insemination; FIV: in vitro fertilization.

Discussion

Conceptus plays a key role in controlling intrauterine environment, modulating essential genes on maternal endometrium (Bazer et al., 2012). In this study we analyzed bovine embryo influence on endometrial expression of angiogenic and vasoactive factors during placentation. Three differentially expressed genes (*GUCY1B3*, *EDNRB*, *ANGPT2*) were selected from a microarray according to their participation in vascular development. Endothelial NOS (*eNOS*) was chosen to compose the gene analysis group, due to its association with NO

synthesis in endothelial cells and with other genes involved in placental vascular development. To an adequate placental development and fetal growth initially is necessary to occur the formation of a vascular plexus, originated from newly formed endothelial cells and angioblasts (Lamalice et al., 2007). This process, called vasculogenesis, occurs in early embryonic phase and is stimulated by VEGF. In contrast, the angiogenesis occurs in greater intensity during placentation, with increase in maternal and fetal blood flow (Reynolds and Redmer, 2001; Reynolds et al., 2002; El-Mousleh et al., 2012; Grazul-Bilska et al., 2014). During angiogenesis preexisting vessels originate new blood vessels (Ucuzian et al., 2010). Even though angiogenesis is primarily required during embryonic development, it extend until adulthood occurring in different pathophysiological processes, such as wound healing, tissue regeneration (Lamalice et al., 2007) and tumor growth (Lamalice et al, 2007; Eklund and Saharinen, 2013). Different growth factors, transcriptional factors and receptors, including the ones here investigated, are involved in placental angiogenesis and vascular function. Those molecules mostly work in a synergic and/or coordinated way on the promotion of vascular development. Our results indicate that conceptus influences *EDNRB*, *ANGPT2* and *GUCY1B3* gene expression in the endometrium, being an active agent in the modulation in uterine microenvironment during the placentation process.

Different patterns of gene expression were observed in AI and IVF pregnancies. An delay in *ANGPT2* and *EDNRB* expression occurred in cotyledon-associated caruncles of IVF gestations. While higher expression of these genes occurred in cotyledon-associated caruncles at days 30 and 35 in AI gestations, these same patterns of expression was occurred only at 40 days of IVF gestations. It is known that the conditions imposed by the culture medium is related to embryonic growth restriction (Farin et al., 2006; Bertolini et al., 2007) which may be related to the delayed response in gene transcription in IVF gestations observed in our

study. An even more distinct result among the reproductive methods were observed for *GUCY1B3* gene, where no statistical differences ($p < 0.05$) was observed in IVF gestations and significant higher expression occurred in cotyledon-associated caruncles at days 30 and 40 in AI gestations. It has been known that IVF-produced embryos show differences in time of development and in morphological and metabolic aspects when compared to *in vivo* embryos (Araujo et al., 2013). Both culture medium and sub-optimal conditions of culture can affect gene expression of the developing embryo (Lonergan et al. 2003; Tesfaye et al., 2004; Lonergan et al, 2006; Rizos et al, 2008). Our results showed a delay and/or an absence in transcriptional response of the analyzed genes in the gravid horns of IVF when compared to AI gestations, suggesting that embryo manipulation during IVF process may modifies embryo regulatory effect on vascular development.

No difference in *eNOS* transcription was observed in AI gestation, occurring only at day 40 following IVF. During pregnancy, *eNOS* participates in regulation of feto-placental blood flow (Kulandavelu et al, 2013) and embryonic/fetal growth (Pallares and Gonzalez-Bulnes, 2008; Kulandavelu et al, 2013). In this phase, the NOS produced by trophoblastic eNOS plays a key role promoting vessel dilatation and preventing platelet adhesion to trophoblast surface during invasives processes in the placenta (Gagioti et al., 2000). *eNOS* was not differentially expressed gene on our microarray, but it was particularly selected due to its ability to synthesized NO on endothelial cells, being detected in placenta of several species since early stages of pregnancy. Several functions are associated to NO, including vascular relaxation, vasodilation, inhibition of platelet aggregation and adhesion to endothelial surface, suppression of apoptosis and anti-inflammatory effect (Dimmeler et al., 1999; Förstermann and Sessa 2011; Khalil et al, 2015). On critical stages of fetal development, it is believed that *in vitro* culture can lead to persistent silencing or increase in genes expression (Wrenzycki et

al., 2001). However, it is most likely to attribute our findings to a response to the growing IVF conceptus. In fact, elevated rates of NO synthesis were demonstrated in mid gestation of sheep, which is a period of fast fetal growth and increase in placental blood flow (Kwon et al., 2004).

Several genes act mutually in the coordination of placental vascular function, and regulate the vascular development in an orchestral manner. In uterine-placental tissues at mid gestation, *eNOS* and *EDNRB* expression were similar, indicating a systematic involvement of both genes on regulation of vascular tonus during the period of fetal growth (Hayash et al., 2012). In our study, a similar expression pattern of these genes was only seen in IVF gestations, once *eNOS* expression did not vary on initial stages of AI pregnancies. EDN1 receptors take part into coordination of several physiological and intracellular mechanisms (Cervar-Zivkovic et al., 2011). Pollock and Pollock (2001) demonstrated that EDNRB blockade results in an increase of blood pressure, with this fact being possibly related to the increased levels of circulating EDN1 and concomitant activation of EDNRA, which exerts vasoconstriction in smooth muscle cells (Cervar et al., 2000). Thus, EDNRB may act as an important regulator of vascular tonus and blood pressure control, attenuating vasoconstrictor effects and promoting vascular protection (Schneider et al., 2007). The role of EDNRB during gestations remains to be elucidated.

A higher expression of *eNOS* occurred at day 40 in IVF gestations, but no differences were observed in the expression levels of its receptor *GUCY1B3* at this gestational age. Comparing different assisted reproductive technologies, Grazul-Bilska et al. (2014) demonstrated no differences in *GUCY1B3* expression in early gestation, regardless of embryonic origin; however, in uterine caruncles and/or fetal membranes, other angiogenic factors were differently expressed, including *ANGPT2* and *eNOS*. eNOS controls NO

expression on endothelial cells, which activates sGC receptor and promotes the relaxation of vessels (Denninger and Marletta, 1999; Borowicz et al., 2007). sGC is a heterodimeric hemoprotein composed of subunits $\alpha_{1,2}$ and $\beta_{1,2}$, with an isoform $\alpha_1\beta_1$ (GUCY1B3) widely expressed within cell cytoplasm; and therefore, the most studied subunit (Bellingham and Evans, 2007). *GUCY1B3* expression on maternal and/or fetal placental tissues from sheep showed discrete alterations during pregnancy (Borowicz et al., 2007; Grazul-Bilska et al., 2011), which was similar to our results.

Angiopoietin-2 plays a crucial role in placental angiogenesis acting as a modulator protein in vascular growth (Gale et al., 2002; Reynolds et al., 2005) and allowing placenta to increase its size in response to increase in oxygen and fetal metabolic demands (Geva et al., 2002). Bany and Cross (2006) show that mouse conceptus exerts a paracrine effect on *ANGPT2* expression in post-implantation pregnant uterus. In our study, a higher expression of *ANGPT2*, *EDNRB* and *GUCY1B3* were observed in caruncles from gravid horns in the post-implantation period, indicating that transcriptional differences between gravid and non-gravid horns were determined by presence of embryo. Vascular and angiogenic effects can be coordinated synergistically into placenta, with expression of *ANGPT2* and other angiogenic factors correlated to the expression of *eNOS* in caruncular tissues and fetal membranes (Borowicz et al., 2007; Grazul-Bilska et al., 2010; Grazul-Bilska et al., 2011). Interferon- τ (IFN- τ) is the major signaling molecule in maternal recognition of pregnancy of ruminants, and an important regulator of endometrial gene expression in pre-implantation period (Bazer, 2013; Brooks et al., 2014). In ovine luminal epithelial cells, IFN- τ regulated the expression of genes involved in prostaglandin metabolism (*AKR1C1*, *PTGS2*, *PTGES*, *SLC21A2*), apoptosis (*BAD*, *BID*, *CIDEA*, *FADD*, *CASP8B*), angiogenic factors (*VEGFB*, *VEGFC*, *ANGPT1*, *ANGPT2*, *ANGPT4*), blood coagulation factors (*CD93*, *F2RL2*, *ANXA5*, *PLSCR1*) and others

(Chen et al., 2007). In our study, the expression of *ANGPT2* is not directly correlated to conceptus-produced IFN- τ , once our analysis was performed in post-implantation period. However, our results indicated that other regulatory embryonic factors modulate uterine gene expression and further studies are still necessary to elucidate these factors.

Our results indicate that conceptus presence may influence endometrial gene expression during placentation, suggesting that the own embryo modulates angiogenic and vasoactive factors required in early gestational period in response to its growth and placental development. Differences in gene expression of IVF-produced embryo were also observed, suggesting that culture environment and *in vitro* manipulation factors may alter embryo's capability of control the uterine microenvironment during placentation.

Acknowledgment

This work was funded by a National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant to DBC. The authors thank Ivo Pivatto and Evaldo de Almeida Cardoso for supporting during artificial insemination; Claudia Marinovic de Oliveira and Ana Carolina Furlanetto Mançanares for providing AI and IVF samples; Fernando Mesquita for support during mRNA quality analysis, Luciana Alves de Fátima for support during microarray analysis, Magda Fernandes and Luíza M. Almeida for supporting during qPCR analyses and Maria Priscila Amorim for supporting during article translation.

References

- Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593–615.
- Araujo MS, Volpato R and Lopes MD (2013). Produção de embriões bovinos in vitro com sêmen sexado. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia* 11: 8–15.
- Bany BM and Cross JC (2006). Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. *Developmental Biology* 294: 445–456.
- Bazer FW, Song G and Thatcher WW (2012). Roles of Conceptus Secretory Proteins in Establishment and Maintenance of Pregnancy in Ruminants. *Asian-Australas J Anim Sci* 25: 1–16.
- Bazer, FW (2013). Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4: 23.
- Bellingham M and Evans, TJ (2007). The $\alpha 2\beta 1$ isoform of guanylyl cyclase mediates plasma membrane localized nitric oxide signalling. *Cellular Signalling* 19: 2183–2193.

Bertolini M, Bertolini LR, Gerger RPC, Batchelder, CA, Anderson GB (2007). Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations. *Revista Brasileira Reprodução Animal* 31: 391-405.

Borowicz PP, Arnold DR, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer DA and Reynolds LP (2007). Placental Growth Throughout the Last Two Thirds of Pregnancy in Sheep: Vascular Development and Angiogenic Factor Expression. *Biol Reprod* 76: 259–267.

Brooks K, Burns G and Spencer TE (2014). Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5: 53.

Cervar M, Huppertz B, Barth S, Hahn T, Weiss U, Kaufmann P, et al. (2000). Endothelin A and B receptors change their expression levels during development of human placental villi. *Placenta* 21: 536–546.

Cervar-Zivkovic M, Dieber-Rotheneder M, Barth S, Hahn T, Kohnen G, Huppertz B, et al. (2011). Endothelin-1 stimulates proliferation of first-trimester trophoblasts via the A- and B-type receptor and invasion via the B-type receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: 3408–3415.

Chen Y, Antoniou E, Liu Z, Hearne LB and Roberts, RM (2007). A microarray analysis for genes regulated by interferon-tau in ovine luminal epithelial cells. *Reproduction* 134: 123–135.

Denninger JW and Marletta MA (1999). Guanylate cyclase and the $\cdot\text{NO}/\text{cGMP}$ signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411: 334–350.

Dias RG, Negrão CE and Krieger MH (2011). Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arq. Bras. Cardiol.* 96: 68–75.

Dimmeler S and Zeiher AM (1999). Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ.* 6: 964–968.

Diskin M and Morris D (2008). Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 260–267.

Ealy AD, Eroh ML and Sharp DC (2010). Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Animal Reproduction Science* 117: 99–105.

Eklund L and Saharinen P (2013). Angiopoietin signaling in the vasculature. *Experimental Cell Research* 319: 1271–1280.

El-Mousleh T, Casalis PA, Wollenberg I, Zenclussen ML, Volk HD, Langwisch S, et al. (2012). Exploring the potential of low doses carbon monoxide as therapy in pregnancy complications. *Med. Gas. Res.* 2: 4.

Fam NP, Verma S, Kutryk M and Stewart DJ (2003). Clinician guide to angiogenesis. *Circulation* 108: 2613–2618.

Farin PW, Piedrahita JA and Farin CE (2006). Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65: 178–191.

Frommer KW and Müller-Ladner U (2008). Expression and function of ETA and ETB receptors in SSc. *Rheumatology (Oxford)* 47: 27–28.

Förstermann U and Sessa WC (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33: 829–837, 837a–837d.

Fukuhara S, Sako K, Noda K, Nagao K, Miura K and Mochizuki N (2009). Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by Angiopoietin-1. *Exp. Mol. Med.* 41: 133–139.

Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M and Nishikibe M (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1461–1465. doi:10.1006/bbrc.1994.1395.

Gaglioti S, Scavone C and Bevilacqua E (2000). Participation of the Mouse Implanting Trophoblast in Nitric Oxide Production During Pregnancy. *Biol. Reprod.* 62: 260–268.

Galabova-Kovacs G, Matzen D, Piazzolla D, Meissl K, Plyushch T, Chen AP, et al. (2006). Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 1325–1330.

Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain, J, et al. (2002). Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1. *Developmental Cell* 3: 411–423.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, et al. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59: 599–616.

Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A and Jaffe RB (2002). Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 4213–4224.

Grazul-Bilska, A. T., Borowicz, P. P., Johnson, M. L., Minten, M. A., Bilski, J. J., Wroblewski, R., et al. (2010). Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction* 140, 165–174. doi:10.1530/REP-09-0548.

Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Borowicz PP, Minten M, Bilski JJ, Wroblewski R, et al. (2011). Placental development during early pregnancy in sheep: cell proliferation, global methylation, and angiogenesis in the fetal placenta. *Reproduction* 141: 529–540.

Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Borowicz PP, Bilski JJ, Cymbaluk T, Norberg S, et al. (2014). Placental development during early pregnancy in sheep: effects of embryo origin on vascularization. *Reproduction* 147: 639–648.

Gu J, Yamamoto H, Ogawa M, Ngan C, Danno K, Hemmi H, et al. (2006). Hypoxia-induced up-regulation of angiopoietin-2 in colorectal cancer. *Oncology Reports*.

Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA and Taylor HS (2009). The Role of Growth Factors and Cytokines during Implantation: Endocrine and Paracrine Interactions. *Semin. Reprod. Med.* 27: 62–79.

Hanahan, D (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48–50.

Hayash KG, Hosoe M and Takahashi T (2012). Placental expression and localization of endothelin-1 system and nitric oxide synthases during bovine pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 134: 150–157.

Herington JL and Bany BM (2009). Do Molecular Signals from the Conceptus Influence Endometrium Decidualization in Rodents? *J Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 312: 797–816.

Khalil A, Hardman L and O'Brien P (2015). The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. *Amino Acids* 47: 1715–1727.

Kim M, Seo H, Choi Y, Shim J, Kim H, Lee CK, et al. (2012). Microarray Analysis of Gene Expression in the Uterine Endometrium during the Implantation Period in Pigs. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 25: 1102–1116.

Krause BJ, Hanson MA and Casanello P (2011). Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta* 32: 797–805.

Kulandavelu S, Whiteley KJ, Bainbridge SA, Qu D and Adamson SL (2013). Endothelial NO synthase augments fetoplacental blood flow, placental vascularization, and fetal growth in mice. *Hypertension* 61: 259–266.

Kwon H, Wu G, Meininger CJ, Bazer FW and Spencer TE (2004). Developmental Changes in Nitric Oxide Synthesis in the Ovine Placenta. *Biol. Reprod.* 70: 679–686.

Lamalice L, Boeuf FL and Huot J (2007). Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research* 100: 782–794.

Li, Y., Zhou, X., Wei, Q., Huang, R., and Shi, F. (2014). Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase α and β subunits in postnatal porcine uteri. *Acta Histochemica* 116: 466–473.

Lima IMT and Souza AL (2009). Desenvolvimento e Sobrevivência de Embriões no Período de Pré-implantação: Enfoque em Ruminante. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 33: 194-202.

Lonergan P, Kanka J, Rizos D, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, et al. (2003). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction* 126: 337–346.

Lonergan P, Corcoran D, Fair T and Evans, ACO (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65: 137–152.

McConaha M, Eckstrum K, An J, Steinle J and Bany B (2011). Microarray Assessment of the Influence of the Conceptus on Gene Expression in the Mouse Uterus During Decidualization. *Reproduction* 141: 511–527.

Miles JR, Alexander JE, Farin CE, Rodriguez KF and Farin PW (2004). Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.* 71: 1919–1926.

Miles JR, Alexander JE, Farin CE, Rodriguez KF and Farin PW (2005). Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation. *Biol. Reprod.* 73: 663–671.

Montrezor LH, Piccinato CA, Collares CVA, Vireque AA and Silva AAMRE (2015). Effects of angiotensin II, atrial natriuretic peptide and endothelin-1 on proliferation and steroidogenic output of bovine granulosa cells cultured in a chemically defined system. *Anim. Reprod. Sci.* 152: 8–16.

Moss A (2013). The angiopoietin:Tie 2 interaction: a potential target for future therapies in human vascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24: 579–592.

Nakane M (2003). Soluble guanylyl cyclase: physiological role as an NO receptor and the potential molecular target for therapeutic application. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41: 865–870.

Pallares P and Gonzalez-Bulnes A (2008). Intrauterine growth retardation in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice is established from early stages of pregnancy. *Biol. Reprod.* 78: 1002–1006.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.

Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, et al. (2011). eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J. Endocrinol.* 210: 271–284.

Reynolds LP and Redmer DA (1995). Utero-placental vascular development and placental function. *J. Anim. Sci.* 73: 1839–1851.

Reynolds LP and Redmer DA (2001). Angiogenesis in the placenta. *Biol. Reprod.* 64: 1033–1040.

Reynolds LP, Grazul-Bilska AT and Redmer DA (2002). Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int. J. Exp. Pathol.* 83: 151–163.

Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Wallace JM, et al. (2005). Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 26: 689–708.

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P and Gutiérrez-Adán A (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 44–50.

Roviezzo F, Cuzzocrea S, Di Lorenzo A, Brancalone V, Mazzon E, Di Paola R, et al. (2007). Protective role of PI3-kinase-Akt-eNOS signalling pathway in intestinal injury associated with splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol* 151: 377–383.

Schneider MP, Boesen EI and Pollock DM (2007). Contrasting Actions of Endothelin ETA and ETB Receptors in Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 731–759.

Spencer TE, Sandra O and Wolf E (2008). Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* 135: 165–179.

Tesfaye D, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M and Schellander K (2004). A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. *Reprod. Domest. Anim.* 39: 396–404.

Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N and Stefanadis C (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10: 4–18.

Ucuzian AA, Gassman A A, East AT and Greisler HP (2010). Molecular Mediators of Angiogenesis. *J. Burn Care Res.* 31: 158.

Wrenzycki C, Herrmann D, Keskintepe L, Martins A, Sirisathien S, Brackett B, et al. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum. Reprod.* 16: 893–901.

Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA and Parikh SM (2009). Angiopoietin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium. *Mol Cell Biol* 29: 2011–2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste estudo podemos observar diferenças significativas na expressão de genes em cornos gestantes quando comparados a cornos não gestantes, enfatizando o papel regulatório do embrião na modulação gênica endometrial durante a placentação. Um retardamento na transcrição de genes foi observado nas amostras de cornos gestantes obtidas com a transferência de embriões produzidos *in vitro*, o que pode ser atribuído a cultura e as condições subótimas impostas pela mesma. Fatores angiogênicos e vasoativos são fundamentais para o desenvolvimento placentário, permitindo o adequado crescimento fetal e manutenção dos demais estágios gestacionais. Tanto a inseminação artificial quanto a produção *in vitro* de embriões são ferramentas essenciais para produtividade da cadeia pecuária bovina, e espera-se que os resultados apresentados possam contribuir para compreensão dos mecanismos de falhas de desenvolvimento vascular placentário conceito-maternal em gestações naturais e por transferência de embriões produzidos *in vitro*, em virtude da escassez dessas informações durante o período de placentação.

REFERÊNCIAS

ALBERTO, J. et al. Relationship Between IFN- τ Production by Bovines Embryos Derived Ex Vivo and Completely Produced In Vitro. In: MANAFI, M. (Ed.). . **Artificial Insemination in Farm Animals**. [s.l.] InTech, 2011.

ALDERTON, W K; COOPER, C E; KNOWLES, R G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 2001.

ANTONIAZZI, A. Q. et al. The role of interferon-tau during maternal recognition of pregnancy in ruminants. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 176–185, 2011.

ARAÚJO, M. C. C. et al. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos in vitro frescos e congelados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 752–756, dez. 2005.

BAGNATO, A.; NATALI, P. G. Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 16, 27 maio 2004.

BANY, B. M.; CROSS, J. C. Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. **Developmental Biology**, v. 294, n. 2, p. 445–456, 15 jun. 2006.

BAZER, F. W. et al. Interferons and Uterine Receptivity. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, n. 01, p. 090–102, jan. 2009.

BAZER, F. W. et al. Uterine Histotroph and Conceptus Development: Select Nutrients and Secreted Phosphoprotein 1 Affect Mechanistic Target of Rapamycin Cell Signaling in Ewes. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1094–1107, 12 jan. 2011.

BAZER, F. W. et al. Roles of Conceptus Secretory Proteins in Establishment and Maintenance of Pregnancy in Ruminants. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1–16, jan. 2012.

BAZER, F. W. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 23, 2013.

BHAVINA, K. et al. VEGF and eNOS Expression in Umbilical Cord from Pregnancy Complicated by Hypertensive Disorder with Different Severity. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

BINELLI, M. et al. Bovine Interferon- τ Stimulates the Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway in Bovine Endometrial Epithelial Cells. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 2, p. 654–665, 2 jan. 2001.

BOGDANOVIC, E. et al., D. J. Activation of Tie2 by angiopoietin-1 and angiopoietin-2 results in their release and receptor internalization. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 17, p. 3551–3560, 2006.

BOROWICZ, P. P. et al. Placental Growth Throughout the Last Two Thirds of Pregnancy in Sheep: Vascular Development and Angiogenic Factor Expression. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 2, p. 259–267, 2007.

BOWEN, J. A. et al. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 5, p. 1098–1106, nov. 1996.

BRAYMAN, M. et al. MUC1: A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 2, p. 4, 7 jan. 2004.

BRIDGES, P. J.; CHO, J.; KO, C. Endothelins in regulating ovarian and oviductal function. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 3, p. 145–155, 2011.

BRINDLE, N. P. J. et al. Signaling and Functions of Angiopoietin-1 in Vascular Protection. **Circulation Research**, v. 98, n. 8, p. 1014–1023, 2006.

BROOKS, K. et al. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 53, 16 nov. 2014.

CARY, S. P. L. et al. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 4, p. 231–239, 2006.

CERVAR, M. et al. Endothelin A and B Receptors Change their Expression Levels During Development of Human Placental Villi. **Placenta**, v. 21, n. 5–6, p. 536–546, 2000.

CERVAR-ZIVKOVIC, M. et al. Endothelin-1 stimulates proliferation of first-trimester trophoblasts via the A- and B-type receptor and invasion via the B-type receptor. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 11, p. 3408–3415, 2011.

CHARNOCK-JONES, D S. Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature. **Journal of Anatomy**, v. 200, n. 6, p. 607–615, 2002.

CHOI, D-H. et al. Expression pattern of endothelin system components and localization of smooth muscle cells in the human pre-ovulatory follicle. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 26, n. 5, p. 1171–1180, 2011.

CLARK, J. **What is nitric oxide and how does it work? - Nutrition Express Articles.** Nutrition Express. Disponível em:

<http://www.nutritionexpress.com:9080/showarticle.aspx?articleid=286>. Acesso em: 1 ago. 2015.

DAVIS, S. et al. Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning. **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1161–1169, 1996.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 41–49, 1 jan. 2001.

DENIPOTI, C. H., MORAES, S.M.F., HERNANDES, L. Angiogênese e exercício. **Arquivos do Mudi**, v. 10, n. 2, p. 17-22, 2006.

DENNINGER, J. W; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1411, n. 2–3, p. 334–350, 1999.

DERBYSHIRE, E. R.; MARLETTA, M. A. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 533–559, 2012.

DESTRO, F. C. et al. Atuação do Interferon-tau no reconhecimento materno da gestação. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 9, n. 2, p. 338–347, 16 dez. 2014.

DIAS, R. G. et al. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 1, p. 68–75, 2011.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 43 Suppl 2, p. 260–267, jul. 2008.

DORNIK, P. et al. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 4, p. 1627–1638, 1 abr. 2013.

DUHIG, Kate E.; SHENNAN, Andrew H. Recent advances in the diagnosis and management of pre-eclampsia. **F1000Prime Reports**, v. 7, 2015.

DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1-2, p. 39–44, 28 fev. 2000.

DUNK, C. et al. Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Activate Trophoblast Tie-2 to Promote Growth and Migration during Placental Development. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 6, p. 2185–2199, 2000.

DUSSE, L. M. S. et al. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EALY, A. D. et al. Identification of interferon- τ isoforms expressed by the peri-implantation goat (*Capra hircus*) conceptus. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, n. 1, p. 39–49, jul. 2004.

FAGIANI, E.; CHRISTOFORI, Gerhard. Angiopoietins in angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 328, n. 1, p. 18–26, 2013.

FAIR, T. The Contribution of the Maternal Immune System to the Establishment of Pregnancy in Cattle. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 28 jan. 2015.

FAM, N. P. et al. Clinician Guide to Angiogenesis. **Circulation**, v. 108, n. 21, p. 2613–2618, 2003.

FARIN, P. W. et al. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178–191, 7 jan. 2006.

FLORES VALDEZ, N. Endothelin-1: intrinsic vasoconstrictor vascular endothelial. **Revista Med**, v. 21, n. 2, p. 64–78, 2013.

FORDE, N. et al. Proteomic analysis of uterine fluid during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 147, n. 5, p. 575–587, maio 2014.

FROMMER, K. W; MÜLLER-LADNER, U. Expression and function of ETA and ETB receptors in SSc. **Rheumatology**, v. 47, p. 27–28, 2008.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 521–534, 2006.

GALE, N. W. et al. Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1. **Developmental Cell**, v. 3, n. 3, p. 411–423, 2002.

GEVA, E. et al. Human Placental Vascular Development: Vasculogenic and Angiogenic (Branching and Nonbranching) Transformation Is Regulated by Vascular Endothelial Growth Factor-A, Angiopoietin-1, and Angiopoietin-2. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 9, p. 4213–4224, 2002.

GRAZUL-BILSKA, A. T. et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. **Reproduction**, v. 132, n. 4, p. 579–587, 2006.

GRAZUL-BILSKA, A. T. et al. Placental development during early pregnancy in sheep: Effects of embryo origin on vascularization. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 147, n. 5, p. 639–648, 2014.

GREEN, J. C. et al. Measurement of interferon-tau (IFN-tau) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 24–33, ago. 2010.

HAENDLER, B. et al. Molecular cloning of human endothelin (ET) receptors ETA and ETB. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 20 Suppl 12, p. S1–4, 1992.

HANAHAN, D. Signaling Vascular Morphogenesis and Maintenance. **Science**, v. 277, n. 5322, p. 48–50, 1997.

HANSEN, T. R. et al. Interferon RNA of embryonic origin is expressed transiently during early pregnancy in the ewe. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 26, p. 12801–12804, 15 set. 1988.

HARRISON-BERNARD, L. M. et al. Enhanced Vascular Chymase-Dependent Conversion of Endothelin in the Diabetic Kidney. **The Ochsner Journal**, v. 13, n. 1, p. 49–55, 2013.

HARTENECK, C. et al. Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. **FEBS letters**, v. 292, n. 1-2, p. 217–222, 1991.

HASHIZUME, K. Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, p. 1–11, fev. 2007.

HAYASHI, K-G. et al. Placental expression and localization of endothelin-1 system and nitric oxide synthases during bovine pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 3-4, p. 150–157, 2012.

HERINGTON, J. L.; BANY, B. M. Do Molecular Signals from the Conceptus Influence Endometrium Decidualization in Rodents? **Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution**, v. 312, n. 8, p. 797–816, 15 dez. 2009.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673–687, 20 set. 2002.

INOUE, A. et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 8, p. 2863–2867, 1989.

JOHNSON, G. A. et al. Muc-1, Integrin, and Osteopontin Expression During the Implantation Cascade in Sheep. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 820–828, 9 jan. 2001.

JOHNSON, M. L. *et al.* Effects of estradiol-17 β on expression of mRNA for seven angiogenic factors and their receptors in the endometrium of ovariectomized (OVX) ewes. **Endocrine**, v. 30, n. 3, p. 333–342, 2006.

KAWANABE, Y.; NAULI, S. M. Endothelin. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 2, p. 195–203, 2011.

KEMP-HARPER B, SCHMIDT HH. cGMP in the vasculature. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 191, p. 447-467, 2009.

KHALIL, A. et al. The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. **Amino Acids**, 2015.

KHIMJI, AL-K.; ROCKEY, D. C. Endothelin—Biology and disease. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 11, p. 1615–1625, 2010.

KHODOROVA, A. et al. ENDOTHELIN RECEPTORS AND PAIN. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 10, n. 1, p. 4–28, jan. 2009.

KIM, Y. J. *et al.* Reduced L-arginine Level and Decreased Placental eNOS Activity in Preeclampsia. **Placenta**, v. 27, n. 4–5, p. 438–444, 2006.

KLEIN, C.; TROEDSSON, M. H. T. Transcriptional Profiling of Equine Conceptuses Reveals New Aspects of Embryo-Maternal Communication in the Horse. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 872–885, 5 jan. 2011.

KOWALCZYK, A. et al. The Role of Endothelin-1 and Endothelin Receptor Antagonists in Inflammatory Response and Sepsis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 63, p. 41–52, 2015.

LEE, K. Y.; DEMAYO, F. J. Animal models of implantation. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 128, n. 6, p. 679–695, dez. 2004.

LEVIN, E. R. Endothelins. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 6, p. 356–363, 1995.

LIMA, I.M.T.; SOUZA A.L. Desenvolvimento e Sobrevivência de Embriões no Período de Pré-implantação: Enfoque em Ruminante. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.194-202, 2009.

LINARES, P. M. et al. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 3, p. 183–190, 2014.

LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 137–152, 7 jan. 2006.

LOPES, I. M. R. S. et al. Endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the window of implantation. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 6, p. 702–709, dez. 2011.

MACINTYRE, D. M. et al. Implantation-Associated Changes in Bovine Uterine Expression of Integrins and Extracellular Matrix. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1430–1436, 5 jan. 2002.

MADDOX-HYTTEL, P. et al. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 125, n. 4, p. 607–623, abr. 2003.

MAISONPIERRE, P. C. et al. Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. **Science**, v. 277, n. 5322, p. 55–60, 1997.

MAUL, H. et al. Nitric Oxide and its Role During Pregnancy: From Ovulation to Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 5, p. 359–380, 2003.

MCDOWELL, K. J. et al. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 340–348, set. 1988.

MIKAMI, T. et al. Molecular cloning of cDNAs and expression of mRNAs encoding alpha and beta subunits of soluble guanylyl cyclase from medaka fish *Oryzias latipes*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 253, n. 1, p. 42–48, 1998.

MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 8, p. 584–594, ago. 2006.

MOSS, A. The angiopoietin:Tie 2 interaction: A potential target for future therapies in human vascular disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 6, p. 579–592, 2013.

NAGAOKA, K. et al. Implantation in Ruminants: Changes in Pre-Implantation, Maternal Recognition of Pregnancy, Control of Attachment and Invasion. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 13, n. 6, p. 845–855, 1 jun. 2000.

NAKAYA, Y.; MIYAZAWA, T. The Roles of Syncytin-Like Proteins in Ruminant Placentation. **Viruses**, v. 7, n. 6, p. 2928–2942, jun. 2015.

NCBI. **GUCY1B3 guanylate cyclase 1, soluble, beta 3 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2983>. Acesso em: 6 ago. 2015.

NIMMEGEERS, S. et al. Functional role of the soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ subunit in vascular smooth muscle relaxation. **Cardiovascular Research**, v. 76, n. 1, p. 149–159, 2007.

NORIS, M. et al. L-Arginine Depletion in Preeclampsia Orients Nitric Oxide Synthase Toward Oxidant Species. **Hypertension**, v. 43, n. 3, p. 614–622, 2004.

NORIS, M. et al. Mechanisms of Disease: pre-eclampsia. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 1, n. 2, p. 98–114, 2005.

OESTRUP, O. et al. From zygote to implantation: morphological and molecular dynamics during embryo development in the pig. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 44 Suppl 3, p. 39–49, set. 2009.

OLIVEIRA, L. B. O. DE et al. ANGIOGÊNESE E TUMORIGÊNESE: ONDE OCORRE A INTERSECÇÃO E AS POSSIBILIDADES DE TERAPIAS. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 2, p. 11–22, 21 maio 2013.

OSTRUP, E. et al. Embryo-maternal communication: signalling before and during placentation in cattle and pig. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 23, n. 8, p. 964–975, 2011.

PIAZZA, M. et al. Dynamics of nitric oxide synthase-calmodulin interactions at physiological calcium concentrations. **Biochemistry**, v. 54, n. 11, p. 1989–2000, 2015.

PLATANIAS, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 5, p. 375–386, maio 2005.

POULOS, T. L. Soluble guanylate cyclase. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 6, p. 736–743, 2006. (Catalysis and regulation / Proteins).

PUROHIT, R. et al. Crystal structure of the Alpha subunit PAS domain from soluble guanylyl cyclase. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 22, n. 10, p. 1439–1444, 2013.

RAHEEM, K. A. An insight into maternal recognition of pregnancy in mammalian species. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, [s.d.].

REDMER, D. A. et al. Influence of Maternal Nutrition on Messenger RNA Expression of Placental Angiogenic Factors and Their Receptors at Midgestation in Adolescent Sheep. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 4, p. 1004–1009, 2005.

RIZOS, D. et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 43 Suppl 4, p. 44–50, out. 2008.

SAIDA, K. et al. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 25, p. 14613–14616, 1989.

SAMMIN, D. et al. The ovine placenta and placentitis-A review. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 1-2, p. 90–97, 16 mar. 2009.

SANDRA, O. et al. Maternal organism and embryo biosensing: insights from ruminants. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 108, p. 105–113, abr. 2015.

SATTERFIELD, M. C. et al. Discovery of candidate genes and pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and conceptus elongation. **Physiological Genomics**, v. 39, n. 2, p. 85–99, 1 out. 2009.

SADEGHI, M. R. Present and Prospective Diagnostic and Therapeutic Options for Repeated IVF Failures. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 13, n. 1, p. 1–2, 2012.

SCHNEIDER, M. P.; BOESEN, E. I.; POLLOCK, D. M. Contrasting Actions of Endothelin ETA and ETB Receptors in Cardiovascular Disease. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 47, p. 731–759, 2007.

SEVAL, Y. et al. The Distribution of Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 and Their Receptors Tie-1 and Tie-2 in the Very Early Human Placenta. **Placenta**, v. 29, n. 9, p. 809–815, 2008.

SHAH, S.; HYDE, D. R. Two Drosophila genes that encode the alpha and beta subunits of the brain soluble guanylyl cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 25, p. 15368–15376, 1995.

SHARP, D. C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 679–689, 2 jul. 2000.

SCHAUSER, K. H. et al. Angiotensin-converting enzyme activity in the bovine uteroplacental unit changes in relation to the cycle and pregnancy. **Placenta**, v. 22, n. 10, p. 852–862, nov. 2001.

SILVA, A. S.; ZANESCO, A. Physical exercise, β -adrenergic receptors, and vascular response. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 9, n. 2, p. 47–56, 2010.

SPENCER, T. E. et al. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 128, n. 6, p. 657–668, dez. 2004.

SPENCER, T. E. Biological Roles of Uterine Glands in Pregnancy. **Seminars in reproductive medicine**, v. 32, n. 5, p. 346–357, set. 2014.

STASCH, J-P. et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 212–215, 2001.

STOJKOVIC, M. et al. Secretion of biologically active interferon tau by in vitro-derived bovine trophoblastic tissue. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1500–1507, 12 jan. 1995.

SZÓSTEK, A. Z. et al. Ovarian steroids affect prostaglandin production in equine endometrial cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 3, p. 263–276, 2014.

TAKAGI, M. et al. Messenger RNA expression of angiotensin-converting enzyme, endothelin, cyclooxygenase-2 and prostaglandin synthases in bovine placentomes during gestation and the postpartum period. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 3, p. 398–404, 2008.

TARRADE, A. et al. Analysis of placental vascularization in a pharmacological rabbit model of IUGR induced by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. **Placenta**, v. 35, n. 4, p. 254–259, 2014.

TEIXEIRA, S. A. M. A Importância do óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. **Femina**, v. 34, n. 8, p. 565–570, 2006.

TESFAYE, D. et al. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 39, n. 6, p. 396–404, dez. 2004.

THIBIER M. Data Retrieval Committee Annual Report: Transfer of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. **Embryo Transfer Newslett**, v.24, p.12-18, 2006.

VARAGO, F. C. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.100-109, abr./jun. 2008.

WALKER C. K et al. PReeclampsia, placental insufficiency, and autism spectrum disorder or developmental delay. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 2, p. 154–162, 2015.

WANG, H. et al. Structural and functional insights into the heme-binding domain of the human soluble guanylate cyclase $\alpha 2$ subunit and heterodimeric $\alpha 2\beta 1$. **Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 719–730, 2012.

WULFF, C. et al. Hemochorial Placentation in the Primate: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Angiopoietins, and Their Receptors Throughout Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 802–812, 2002.

YUAN, H. T. et al. Angiopoietin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 8, p. 2011–2022, 2009.

ZABEL, U. et al. Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. **Biochemical Journal**, v. 335, n. Pt 1, p. 51, 1998.

ZANATTA, C. M. et al. Endothelin system function in diabetic nephropathy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 4, p. 581–588, 2008.

ZHU, H. et al. Restoring Soluble Guanylyl Cyclase Expression and Function Blocks the Aggressive Course of Glioma. **Molecular Pharmacology**, v. 80, n. 6, p. 1076–1084, 2011.